

„Die Leute haben (mit Hilfe von Konventionen) alles nach dem Leichten hin gelöst und nach des Leichten leichtester Seite; es ist aber klar, daß wir uns an das Schwere halten müssen; alles Lebendige hält sich daran, alles in der Natur wächst und wehrt sich nach seiner Art und ist ein Eigenes aus sich heraus...“

R. M. Rilke

„Denn unser Wissen ist Stückwerk...
Wir sehen jetzt durch einen Spiegel in einem dunkeln Wort;
dann aber von Angesicht zu Angesicht...“

1. Corinther 13

Untersuchungen zur genetischen und histogenetischen Variabilität an transgenen *Petunia hybrida* Hort. (Vilm.)

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum horticumarum

(Dr. rer. hort.)



eingereicht an der

Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Gartenbauingenieur Klaus Olbricht

geboren am 26.04.1969 in Weimar

Präsident

der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Dr. h.c. Hans Meyer

Dekan

der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät:

Prof. Dr. Dr. h.c. Ernst Lindemann

Gutachter: 1. Prof. F. Pohlheim

2. Prof. G. Forkmann

3. P.D. Dr. W. Schuster

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07. 1998

Abstrakt

key words: *Petunia hybrida*, transgen, Blütenfarbvariation, Epigenetische Periklinalchimäre

Am "Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung" wurde Mitte der achtziger Jahre in eine weißblühende Linie von *Petunia hybrida* Hort. (Vilm.) ein Anthocyansynthese-Gen von *Zea mays* L. transferiert.

Unter den nach diesem Gentransfer entstandenen ziegelrot blühenden Pflanzen befand sich auch ein Typ, der ein Sternmuster in der Blüte zeigt. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Musterbildung auf eine chimärische Konstitution zurückgeführt werden:

Die Instabilität des A1-Gens in der Petunie resultiert in einen Farbstoffausfall in der alleinig farbstoffführenden Epidermis, die von der ersten Scheitelschicht (L1) des Sproßscheitels gebildet wird. Subepidermale Gewebe können als genetisch intakt im Sinne einer potentiellen Fähigkeit zur Farbstoffsynthese charakterisiert werden. Deutlich wird das unter anderem an den partnerinduktiven Wirkungen, die von subepidermale, L2-bürtigen Gewebe ausgehen und die Anthocyanbildung in der benachbarten, farbstoffdefekten Epidermis veranlassen. Da die L1 am Kronblattrand alle Gewebe, also auch das Mesophyll bildet, bleiben diese Bereiche weiß gefärbt. Nur im Binnenfeld der Petalen, wo L2-bürtiges, genetisch intaktes Gewebe an die Epidermen anschließt, treten diese partnerinduktiven Wirkungen auf. Das Resultat ist ein Sternmuster der aus fünf Petalen zusammengewachsenen Kronröhre.

Spontan und nach in-vitro-Kalluskultur entmischen die Pflanzen in ihre einzelnen Komponenten, so daß rot und weiß blühende Typen entstehen, die mit ihrer Blütenfarbe und ihrem Ploidiegrad (unterscheidbar bei Ploidiemarkierung) die jeweilige Scheitelschicht repräsentieren, von der sie abstammen.

Bei Kreuzung spaltet die Nachkommenschaft in rot und weiß blühende Pflanzen auf. Aufgrund der Instabilität des transferierten A1-Gens ergibt sich kein Mendelsches Aufspaltungsverhältnis für die Blütenfarbe, wie das dem heterozygotem Zustand entsprechen würde. Auch existieren (wie bei den Entmischungsprodukten) gesprenkelte Blütentypen.

Die Instabilität konnte als licht- und temperaturabhängig erkannt werden. Sie ist gleichzeitig der Grund dafür, daß sich an weiß blühenden Kallusregeneraten bzw. Sämlingen, die das A1-Gen in inaktiver Form besitzen, ein Sternmuster jederzeit neu bilden kann. Aufgrund dieses modifikativen Charakters dieser Sternmuster-Chimäre wird der Begriff „**Epigenetische Periklinalchimäre**“ vorgeschlagen.

In Sorteneinkreuzungen konnten Instabilitäten bis in die F2-Generation verfolgt werden, möglicherweise übertragen sich die Ursachen der Farbstoffausfälle der transgenen Form auch auf die Farbkomponente des Kreuzungspartners.

Weiterhin enthält die Arbeit Experimente zur Sorteneinkreuzung sowie einen vorläufigen Bestimmungsschlüssel zur generellen Einordnung von Blütenfarbvariation nach ihren Ursachen.

Abstract

key words: petunia hybrida, transgene, flower color variation, epigenetic periklinal chimera

Am "Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung Köln-Vogelsang" wurde Mitte der achtziger Jahre in eine weißblühende Linie von *Petunia hybrida* Hort. (Vilm.) ein Anthocyan synthese-Gen von *Zea mays* L. transferiert.

Unter den nach diesem Gentransfer entstandenen ziegelrot blühenden Pflanzen befand sich auch ein Typ, der ein Sternmuster in der Blüte zeigt. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Musterbildung auf eine chimärische Konstitution zurückgeführt werden:

Die Instabilität des A1-Gens in der Petunie resultiert in einen Farbstoffausfall in der alleinig farbstoffführenden Epidermis, die von der ersten Scheitelschicht (L1) des Sproßscheitels gebildet wird. Subepidermale Gewebe können als genetisch intakt im Sinne einer potentiellen Fähigkeit zur Farbstoffsynthese charakterisiert werden. Deutlich wird das unter anderem an den partnerinduktiven Wirkungen, die von subepidermale, L2-bürtigen Gewebe ausgehen und die Anthocyanbildung in der benachbarten, farbstoffdefekten Epidermis veranlaßt. Da die L1 am Kronblatttrand alle Gewebe, also auch das Mesophyll bildet, bleiben diese Bereiche weiß gefärbt. Nur im Binnenfeld der Petalen, wo L2-bürtiges, intaktes Gewebe an die Epidermen anschließt, treten diese partnerinduktiven Wirkungen auf. Das Resultat ist ein Sternmuster der aus fünf Petalen zusammengewachsenen Kronröhre.

Spontan und nach in-vitro-Kalluskultur entmischen die Pflanzen in ihre einzelnen Komponenten, so daß rot und weiß blühende Typen entstehen, die mit ihrer Blütenfarbe und ihrem Ploidiegrad (unterscheidbar bei Ploidiemarkierung) die jeweilige Scheitelschicht repräsentieren, von der sie abstammen.

Bei Kreuzung spaltet die Nachkommenschaft in rot und weiß blühende Pflanzen auf. Aufgrund der Instabilität des transferierten A1-Gens ergibt sich kein Mendelsches Aufspaltungsverhältnis für die Blütenfarbe, wie das dem heterozygotem Zustand entsprechen würde. Auch existieren (wie bei den Entmischungsprodukten) gesprenkelte Blütentypen.

Die Instabilität konnte als licht- und temperaturabhängig erkannt werden. Sie ist gleichzeitig der Grund dafür, daß sich an weiß blühenden Kallusregeneraten bzw. Sämlingen, die das A1-Gen in inaktiver Form besitzen, ein Sternmuster jederzeit neu bilden kann. Aufgrund dieses modifikativen Charakters dieser Sternmuster-Chimäre wird der Begriff „**Epigenetische Periklinalchimäre**“ vorgeschlagen.

In Sorteneinkreuzungen konnten Instabilitäten bis in die F2-Generation verfolgt werden, möglicherweise übertragen sich die Ursachen der Farbstoffausfälle der transgenen Form auch auf die Farbkomponente des Kreuzungspartners.

Weiterhin enthält die Arbeit einen vorläufigen Bestimmungsschlüssel zur generellen Einordnung von Blütenfarbvariation nach ihren Ursachen.

Inhalt

	Seite
1. Problemdarstellung	1
1.1. Zur Entstehung der transgenen <i>Petunia hybrida</i> Hort. (Vilm.)	1
1.2. Der Untersuchungsgegenstand	3
1.3. Chimärische Blütenmuster	3
1.4. Der Sternmustertyp der transgenen Petunie	4
1.4.1. Phänotypische und gärtnerische Charakteristik	4
1.4.2. Hypothese eines chimärischen Aufbaus der transgenen Sternmusterform	5
2. Material und Methoden	9
2.1. Die drei Wege der Beweisführung	9
2.2. Die doppelte Markierung der Scheitelschichten	10
2.3. Methoden der Ploidiebestimmung	11
2.4. Herstellung von Dauerpräparaten	13
2.5. in-vitro-Kalluskultur	14
2.6. Untersuchungen zur Stabilität des A1-Gens	14
2.7. Technische Ausrüstungen	15
3. Die Ergebnisse und ihre Auswertung	16
3.1. Kolchizinversuch an Stern/DDD	16
3.2. Mikroskopische Untersuchungen / Ploidienachweise	17
3.3. Entmischungsvorgänge / in-vitro-Kalluskultur	27
3.4. Abschließende Ploidiebestimmungen	35
3.4.1. Sternmuster Nr.2, Blütentyp Nr.3 und Sternmusterbildung an weiß/diploid, weiß/tetraploid sowie an der Laubblattvariante G HGG G	35
3.4.2. Ploidievergleiche der einzelnen Varianten	39
3.5. Instabilitäten der Blütenfarbe	42
3.5.1 Bonituren zur Sprenkelungsneigung	45
3.6. Kreuzungsanalysen	46
3.7. Zur Stabilität des A1-Gens bei Sorteneinkreuzung	52
3.8. Somaklonale Variabilität nach in-vitro-Kalluskultur	57
• Farbtafel I einschließlich Legende	
3.9. Überlegungen zur Definition eines reformierten Systems von Blütenfarbvariation	61
4. Diskussion	74
4.1. Ploidienachweise	74

4.2.	Zur Stabilität des A1-Gens	76
4.3.	Betrachtungen zur Gewebekonkurrenz	83
4.4.	Versuchsansatz und Teilergebnisse zur Klärung partnerinduktiver Wirkungen	86
4.5.	Überlegungen zur somaklonalen Variation	90
5.	Zusammenfassung	91
•	Farbtafel II einschließlich Legende	
6.	Literaturverzeichnis	93
7.	Abbildungsverzeichnis	104
•	Selbständigkeitserklärung	109
•	Danksagung	110

1. Problemdarstellung

1.1. Zur Entstehung der transgenen *Petunia hybrida* Hort. (Vilm.)

Die Petunie - eine Gattung von ca. 30 Arten - ist nach ihrer Beschreibung 1803 von JUSSEAU (SINK, 1984) aus ihrer südamerikanischen Heimat nach Europa gebracht worden. Die gezielte Züchtung der schnell zu einer bekannten gärtnerischen Kultur gewordenen Pflanze begann Mitte des letzten Jahrhunderts (BAILEY, 1896/ RUPPRECHT und MIESSNER, 1989). Nicht zuletzt wegen ihrer einfachen vegetativen und generativen Vermehrbarkeit ist sie heute eine Versuchspflanze für genetische und biochemische Forschung (WIJBRANDI und DE BOTH, 1993). Die gehandelten Hybriden sind in ihrer historischen Entstehung nicht klar belegt, chromatographische und elektrophoretische Analysen jedoch wiesen die Beteiligung von *Petunia axillaris* Lam., *Petunia inflata* Fries, *Petunia parodii* Steere und *Petunia violaceae* Lindl. nach (NATARELLA und SINK, 1974 und 1975). Für die Pigmentierung der Kronblätter sind bei Petunien Anthocyane und andere Flavonoide verantwortlich; sie ergeben im Zusammenspiel mit dem pH-Wert einen bestimmten Farbton (SINK, 1984/ GRIESBACH, 1996). Dabei wird normalerweise kein Pelargonidin ausgebildet (MEYER, 1991/ GUTTERSON, 1993).

Eine weiß blühende Petunienlinie wurde im Max-Planck-Institut (MPI) für Züchtungsforschung Köln-Vogelsang zum Ausgangspunkt für einen gentechnischen Versuch. Diese Hybridlinie besitzt weiße bis blaßrosa Blüten. Der Syntheseweg ihrer Blütenfarbstoffe war bekannt (FORKMANN und RUHNAU, 1987/ FORKMANN, 1991). Sie bildet die drei Dihydroflavonole Dihydromyricetin, Dihydroquercetin und Dihydrokaempferol. Während die beiden ersteren (in geringen Konzentrationen vorliegenden) zu Delphinidin- bzw. Cyanidinderivaten umgewandelt werden können, reichert sich Dihydrokaempferol lediglich an (MEYER et al., 1987/ FORKMANN, 1991). Dihydrokaempferol als Vorstufe von Pelargonidin kann nicht umgewandelt werden, weshalb dieser Farbstoff nicht nachweisbar ist (FORKMANN, 1991). Von dem A1-Gen des Mais' ist bekannt, daß es für eine Reduktase codiert, die die Fähigkeit besitzt, Dihydrokaempferol als Substrat zu nutzen (REDDY et al., 1987). Kann nun dieses Gen erfolgreich in die beschriebene Petunienlinie transferiert werden, wird der Syntheseweg bis hin zum Pelargonidin denkbar.

Zusammen mit einem Gen, das für Kanamycinresistenz verantwortlich ist (NPT II), wurde das A1-Gen übertragen (MEYER et al., 1987). Das Resistenzgen NPT II ermöglichte eine Vorselektion auf Kanamycin-Kallusmedium. Unter den Regeneraten der überlebenden Kalli gab es Pflanzen mit ziegelroten Blüten, in denen die gewünschte Pelargonidinsynthese

nachgewiesen werden konnte, variegated Blütenfarbtypen und weiße, die phänotypisch der Ausgangslinie entsprachen (MEYER et al., 1987/ LINN et al., 1990).

GRIESBACH (1993) fand heraus, daß sich mit der nun möglichen Pelargonidinsynthese die Farbstoffgehalte in den Kronblättern insgesamt erheblich erhöhen und dabei zugunsten des Pelargonidingehaltes verschieben, d.h. prozentual wesentlich weniger Delphinidin und Cyanidin synthetisiert wird.

Ein rotblühender Transformant, der das A1-Gen stabil zur Ausprägung brachte und für den später eine intakte Genkopie nachgewiesen werden konnte (PRÖLS und MEYER, 1992/ MEYER und HEIDMANN, 1994), diente zu weitergehenden Experimenten: Eine über Kreuzungen und Selbstungen erzielte homozygote (rote) Linie wurde selektiert und ein Klonbestand aufgebaut. Die Rückkreuzung mit der Ausgangslinie RL01 ließ rot blühende Nachkommen entstehen, die in bezug auf die Blütenfarbe heterozygot sind. 30000 solcher Pflanzen gelangten zu einem Freilandversuch (MEYER et al., 1992/ MEYER, 1995 B). Innerhalb dieses Feldversuchs gab es wiederum neben Pflanzen mit der gewünschten



Abb.1: Sternmuster der transgenen Petunie (Stern/DDD)

ziegelroten Blütenfarbe solche mit Farbvariationen. Unter diesen Farbvarianten war ein weiß-rot sektorierter Typ, der den Eindruck eines Sternmusters vermittelt (MEYER, mündliche Information). Diese Pflanze (Abb.1), von der ein Klonbestand aufgebaut wurde, steht im Mittelpunkt dieser Arbeit und wird seiner homohistisch diploiden Konstitution wegen im weiteren als Stern/DDD bezeichnet.

1.2. Der Untersuchungsgegenstand

Der 1987 beschriebene Gentransfer am MPI war der erste erfolgreiche Versuch, mittels molekulargenetischer Technik eine neue Blütenfarbe zu etablieren. Insbesondere in der Folge dieses Experimentes rückte die Stabilität des transferierten Gens in den Mittelpunkt der Untersuchungen. Wie beschrieben gab es unter den direkt aus dem Experiment folgenden Transformanten, wie auch innerhalb eines Freilandversuchs bei Pflanzen mit klar definierter genetischer Grundlage (eine Genkopie) zahlreiche Instabilitäten in der Expression des A1-Gens. Die folgende Arbeit widmet sich einer Besonderheit unter den variegaten Formen, einem aus dem Freilandversuch hervorgegangenen Sternmustertyp, und soll Beitrag sein zu einem wissenschaftlichen Gesamtbild über die Stabilität transferierter Gene. An den Anfang gestellt werden dabei zunächst drei primäre Fragen, den Sternmustertyp betreffend:

- Ist das Sternmuster aufgrund seiner phänotypischen Ähnlichkeit mit bekannten, als chimärisch nachgewiesenen Sternmustern ein histogenetisch bedingtes Blütenfarbmuster ?
- Welcher Zusammenhang besteht zwischen Instabilitäten in der Blütenpigmentierung und dem Sternmuster ?
- Bleiben Instabilitäten in Sorteneinkreuzungen erhalten ?

1.3. Chimärische Blütenmuster

Neben Blütenmustern, die genetisch determiniert sind (z.T. zusätzlich modifikativ beeinflusst) und virusbedingter bzw. pflanzensaftübertragbarer Musterung gibt es im Blütenbereich auch solche, die wie Musterungen von Laubblattchimären histogenetische Ursache haben. Genetisch voneinander verschiedene Sproßscheitelschichten beteiligen sich dabei unterschiedlich am Aufbau der Gewebe. Davon abhängig kommt es zu entsprechender Musterung der Organe. Diese Muster lassen sich auf vegetativem (Stecklinge), nicht jedoch auf generativem Wege erhalten. Sie haben eine relative Stabilität, was auch bedeutet, daß sich Sprosse bilden können, die nur eine Komponente verkörpern oder andere Muster aufgrund einer veränderten (vertauschten) Konstitution des Sproßscheitels zeigen (BERGANN und BERGANN, 1962/ POHLHEIM, 1986). Experimentell nachgewiesen sind solche Muster im Blütenbereich bei *Saintpaulia ionantha* H.Wendl. (POHLHEIM, 1980/ LINEBERGER und

DRUCKENBROD, 1985/ PLASCHIL, 1997), *Pelargonium Zonale*- Hybride ‘Rosa Liebling’ (POHLHEIM und RÖSSEL, 1989/ RÖSSEL, 1990) und *Pelargonium Zonale*- Hybride ‘Mr.Wren’ (CASSELLS und MINAS, 1983/ PLASCHIL, 1997), *Mentha arvensis* L. ‘Variegata’ (POHLHEIM, 1971), *Verbena* L. ‘Aphrodite’ (PLASCHIL, 1997), *Rhododendron simsii* L. (HEUERSEL, 1972) *Euphorbia pulcherrima* Willd. ‘Eckes Rosa’ (BERGANN, 1961) und *Myosotis* L. (BATESON, 1926/ CHITTENDEN, 1927), um nur einige zu nennen.

1.4. Der Sternmustertyp der transgenen Petunie

1.4.1. Phänotypische und gärtnerische Charakteristik

Die Petunienblüte besteht aus fünf zu einer Kronröhre zusammengewachsenen Petalen. Dabei sind die Binnenfelder rot gefärbt, an den Kronblatträndern, d.h. im Verwachsungsbereich erscheinen die Petalen weiß. Dadurch kommt der Eindruck eines Sterns zustande (Abb.3). Über Stecklinge ist dieser Typ relativ stabil erhaltbar; ein Klonbestand existiert im Institut seit nunmehr fünf Jahren. Vereinzelt traten an den Sternmusterpflanzen einheitlich weiß, selten auch rot blühende Sprosse auf. Das Blütenmuster geht auf generativem Wege verloren und unterscheidet sich damit von bekannten Sternmustern bestimmter Petuniensorten (siehe Abbildung 2). Die Ausbildung des vererbbaaren Sterns ist zudem temperatur- und lichtabhängig (RÜNGER, 1971 und 1976). Je nach Umweltbedingungen verschiebt sich das Farbverhältnis in Richtung rot bzw. weiß. Diese Modifikation kann beim Sternmuster der transgenen Petunie nicht beobachtet werden.



Abb.2: handelsübliche Sternmustersorte der Petunie



Abb.3: Sternmuster bei der transgenen Petunie

Die für den Sternmustertyp der transgenen Petunie genannten Eigenschaften lassen eine Parallele zu den im vorigen Abschnitt aufgeführten chimärischen Blütenmustern sichtbar werden, was im folgenden als Hypothese formuliert und geprüft werden soll.

1.4.2. Hypothese eines chimärischen Aufbaus der transgenen Sternmusterform

- **Anatomie und Histogenese**

Blütentriebe von *Petunia* folgen einem sympodialen Verzweigungssystem, endständig steht die Infloreszenz, seitlich wird das weitere Sproßwachstum fortgesetzt (SINK, 1984/STRASBURGER et al., 1989). Im stereomikroskopischen Bild (Abb. 4) ist diese Abfolge



Abb.4: Verzweigungsmodus
(Photoprintbild/Stereomikroskop)

sichtbar: Der Sproßscheitel von *Petunia* besteht aus drei separaten Zellschichten (CORNU und BUGNON, 1971). Einem von NAPP-ZINN (1984 und 1988) formulierten generellen Aufbau von Angiospermenblättern zufolge bildet in der Regel die erste Scheitelschicht (L1) obere und untere Epidermis, das Palisadengewebe geht von L2 und das übrige Mesophyll von der dritten Schicht (L3) aus. Nach WEBERLING (1981) unterbleibt hingegen bei Kronblättern die Untergliederung in Palisaden und Schwammparenchym (siehe auch Abb.5). Inwieweit überhaupt eine dritte Scheitelschicht sich am Aufbau des Kronblattes beteiligt, ist nicht bewiesen, erscheint anatomischen Befunden nach

aber eher unwahrscheinlich. Bereits beim Kelchblatt ist bei Laubblattchimären am Phänotyp (siehe 3.8.) eine Beteiligung von nur zwei Scheitelschichten ablesbar.

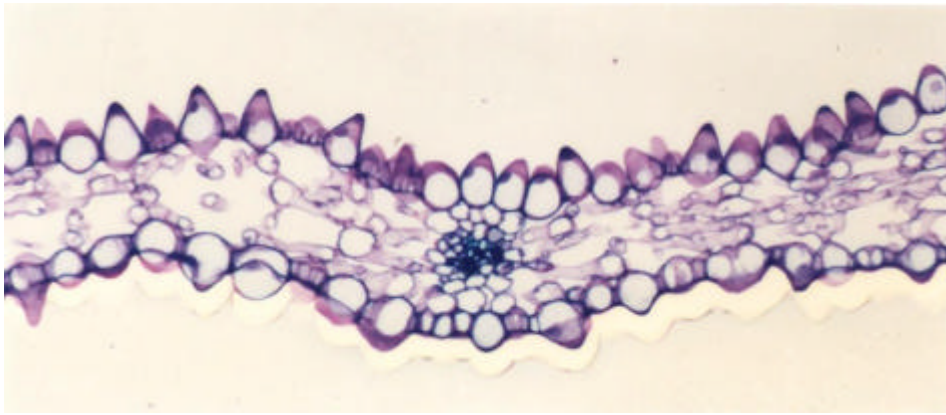


Abb.5:
Kronblatt
im
Querschnitt
(Kunststoff-
einbettung)

Bei Petunien findet die Farbstoffsynthese hauptsächlich in der oberen, in stark abgeschwächter Intensität in der unteren Petalenepidermis statt. Es handelt sich um Vakuolenfarbstoffe (SINK, 1984/ BINO et al., 1984/ MEYER, 1991).

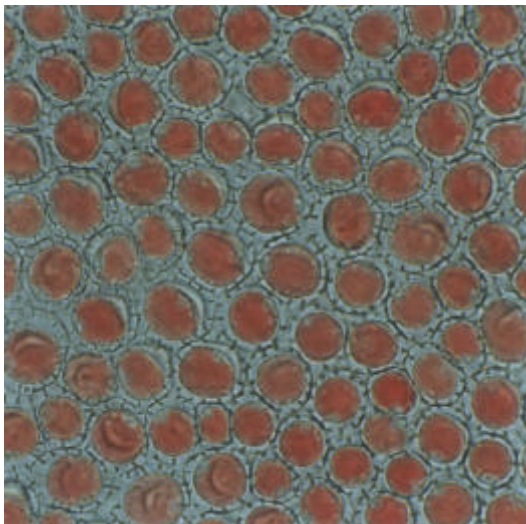


Abb.6: obere Petalenepidermis
Stern/DDD
(Plasmolyse mit KNO_3 -Lösung)

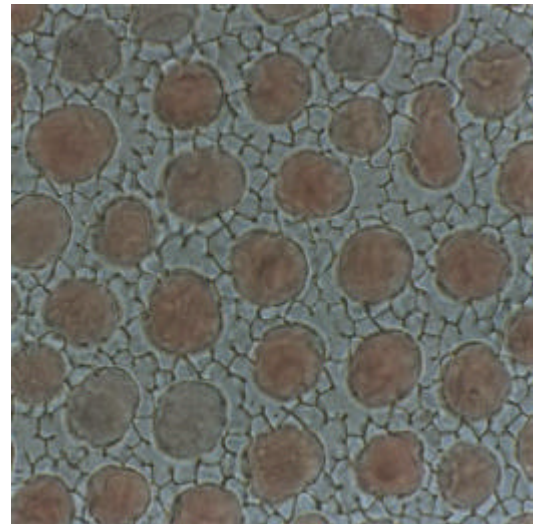


Abb. 7: untere Petalenepidermis
Stern/DDD
(Plasmolyse mit KNO_3 -Lösung)

Im Mesophyll hingegen ist kein Farbstoff lokalisiert:



Abb.8: Farbstoffverteilung im
Petalenquerschnitt
(rotes Binnenfeld Stern/DDD)

Die weißen Sektoren des Sternmusters weisen auf einen Farbdefekt hin. Es gibt also Bereiche in den Epidermen, wo Pelargonidinderivate gebildet werden (Binnenfeld der Petalen) und angrenzend einen Petalenrand ohne diesen Farbstoff. Diese widersprüchliche Situation könnte mit partnerinduktiven Wirkungen und der alleinigen Beteiligung einer anthocyandefekten L1 am Petalenrandmesophyll erklärt werden. Solche Sachverhalte sind von chimärischen Pflanzen bekannt.

- **Partnerinduktion**

Als "interzelluläre Genwirkung" (POHLHEIM und RÖSSEL, 1989) wird Partnerinduktion bislang bezeichnet. Sie ist immer dann möglich, wenn zwei genetisch verschiedene Partner unmittelbaren Gewebekontakt haben, wie das bei einer Periklinalchimäre der Fall ist. Zwei unterschiedliche Wirkungsrichtungen sind dabei möglich:

- a: hemmende Wirkung des genetisch defekten auf den unveränderten Partner
 (Bleichwirkung bei der *Pelargonium-Zonale*-Hybride 'A Happy Thought':
 POHLHEIM und RÖSSEL, 1989)

- b: kompensierende Wirkung des intakten Partners in bezug auf den Defekt des mutierten
 (z. B. Ausgleich eines Anthocyandefektes in L1 bei der *Pelargonium-Zonale*-Hybride '
 'Kleiner Liebling': POHLHEIM und RÖSSEL, 1989,
 Kompensation eines Farbdefektes in L1 bei *Saintpaulia ionantha* Wendl.:
 POHLHEIM, 1980)

Erstmalig eindeutig nachgewiesen wurde die Partnerinduktion in Form einer Kompensationswirkung an den Brakteen bei *Euphorbia pulcherrima* Willd. 'Eckes Rosa' von BERGANN (1961 und 1962). Bei dieser Pflanze, deren Epidermis aufgrund einer Anthocyanverlustmutation in L1 die Fähigkeit zur Farbausbildung verloren hatte, kam es dennoch zu einer schwachen Anthocyanausprägung (rosa) in der Epidermis, da zur Anthocyanbildung befähigtes Gewebe (L2-bürtig) unterlagert ist. Daß es sich bei dieser Sorte um eine Chimäre handelt, wird u. a. dadurch belegt, daß 'Eckes Rosa' aus einer scharlachroten Form entstand und selbst eine weiße Sorte ('Eckes Weiß') durch perikline Aufspaltung der L1 hervorbrachte (BRABEC, 1965).

Ebenfalls einen intermediären Phänotyp beschreibt PEREAU-LEROY (1974) bei der Nelkensorte 'Jacqueline'. Seiner Darstellung nach befindet sich eine für gelbe Blütenfarbe

veranlagte Außenkomponente über einer (genetisch) "roten" Innenkomponente, wobei durch partnerinduktive Wirkungen die Kronblätter dieser Periklinalchimäre orange gefärbt erscheinen. Nachfolgende Untersuchungen der Farbstoffsynthese an einer orangefarbenen Nelkenform ergaben jedoch, daß die orange Färbung nicht durch partnerinduktive Kompensation des Defektes, sondern neben der Bildung gelber Farbpigmente durch die rein chemisch, also spontan mögliche Fortsetzung des unterbrochenen Pelargonidinsyntheseweges (Chalcon zu Flavanon) zustande kommt (FORKMANN und DANGELMAYR, 1980 / FORKMANN: mündliche Information). Diese Erklärung erscheint aufschlußreich, zumal der von PEREAU-LEROY gewählte Weg des Chimärenachweises über Entmischungen von ploidiemarkierten Pflanzen durch die Zuhilfenahme von Bestrahlung Raum für Fehlinterpretationen (Mutationsauslösungen durch Strahlung) schafft.

Bei den Chimera-Sorten von *Saintpaulia* entstehen durch partnerinduktive Wirkungen Zweifarbigkeiten, die an ein Sternmuster erinnern (PLASCHIL, 1997).

Die Ursache dieser Wechselwirkungen ist noch nicht aufgeklärt, man vermutet Beeinflussung mittels diffundierender Wirkstoffe (BRABEC, 1965). Zumindest kann wohl davon ausgegangen werden, daß es sich um biochemisch-physiologische Wechselwirkungen handelt (RÖSSEL, 1990). Diese nur globalen Aussagen näher an Details heranzuführen, ist das Ziel einer eigenständigen, unter Punkt 4.4. erklärten Versuchsanstellung.

Unter den genannten Voraussetzungen lassen sich für den Sternmustertyp der transgenen Petunie folgende **Hypothesen** formulieren:

1. Die erste Scheitelschicht (L1) ist Träger eines Farbdefekts von ursprünglich roter zu weißer Petalenfärbung.
2. Im Randbereich der Petalen werden im Gegensatz zum Petalenbinnenfeld Epidermen *und* Mesophyll von der L1 gebildet und sind deshalb genotypisch gleiche Gewebe.
3. Obwohl die Farbstoffsynthese auf die Epidermen beschränkt und die sie bildende L1 farbdefekt ist, zeigt sich die fehlende Pigmentierung nur in den Verwachsungszonen der Petalen. Im Binnenfeld der Petalen ist die L1-bürtige, anthocyandefekte Epidermis von intaktem, L2-bürtigem Mesophyll unterlagert. In diesen Bereichen kommt es zur Farbstoffinduktion in den Epidermen (→Partnerinduktion)
4. Sind die Punkte 1. bis 3. erfüllt, ist die Sternform der transgenen *Petunia hybrida* eine Monektochimäre.

2. Material und Methoden

2.1. Die drei Wege der Beweisführung

Um die chimärische Konstitution einer Pflanze zu prüfen, sind drei Wege notwendig:

- ◆ Prüfung des Entmischungsverhaltens
- ◆ doppelte Markierung der Scheitelschichten
- ◆ Prüfung der Erbllichkeit

1. ENTMISCHUNG gilt gleichermaßen als Eigenschaft wie auch als Nachweismethode von Chimären. Durch Umschichtungen an den Sproßscheiden (layer-reduplication, layer-perforation, layer-translocation) kann zum Beispiel eine Schicht die andere verdrängen, bzw. sie vertauschen einander ihre Lage. Es ist damit möglich, daß homohistische Pflanzen entstehen bzw. Pflanzen mit einer neuen chimärischen Konstitution (BERGANN und BERGANN, 1962/ POHLHEIM, 1982 und 1986/ RASHID, 1993). Eine weitere Möglichkeit der Entmischung ist der Wurzelaustrieb, der in der Regel dann die L3-Komponente einer Pflanze verkörpert. Als Testmethode für Chimären ist er unter der Bezeichnung "Bateson-Test" in die Literatur eingegangen (BATESON, 1916). Entmischung kann als Sproßvariation verstanden werden und spontan an einer Pflanze auftreten. Eine Trennung der chimärischen Komponenten mit hoher Wahrscheinlichkeit ist die in-vitro-Kalluskultur. Dort können Regenerate aus einzelnen Zellen entstehen und damit entsprechende Sproßscheiden repräsentieren. Auch traditionelle Vermehrungstechniken sind geeignet, Entmischungen herbeizuführen, wie z. B. bei *Saintpaulia ionantha*, wo Regenerate aus Blattstecklingen von epidermalemem Gewebe abstammen und somit einheitlich den Genotyp der ersten Scheitelschicht zeigen (LANGE, 1992/ LINEBERGER, 1996/ PLASCHIL, 1997).

Für die transgene Sternmusterform von *Petunia hybrida* bedeutet das:

In einem großen Klonbestand müßten nach einer ausreichenden Zeitspanne Sprosse mit entweder einheitlich weißen oder einheitlich roten Blüten entstehen. Eine in-vitro-Kalluskultur mit anschließender Erdüberführung läßt weiß und rot blühende Pflanzen erwarten. Obgleich BINO et al. (1984) davon ausgehen, daß bei *Petunia* Regenerate in der Regel von L1-bürtigem Epidermisgewebe abstammen, kann Regeneration aus subepidermalen Schichten nicht ausgeschlossen werden (BINO et al., 1984/ HANDRO et al., 1973). Der

Bateson-Test zur Isolierung der L3-Komponente hätte wenig Erfolg, da Wurzelaustriebe bei *Petunia* nicht beobachtet wurden.

2. DOPPELTE MARKIERUNG BEI PERIKLINALCHIMÄREN hat zum Ziel, einzelne Scheitelschichten mit zwei Merkmalen zu kennzeichnen, so daß möglicherweise bereits am Phänotyp, sicher jedoch durch cytologische bzw. histologische Befunde einzelne Schichten vor allem in ihrer Histogenese klar erkannt und voneinander abgegrenzt werden können. Eine solche Markierung erreicht man durch Mutationen, beispielsweise durch Induktion eines Chlorophylldefektes als Plastidommutation oder die Erhöhung der Ploidiestufe einer Schicht als Genommutation. Letzteres ist möglich durch die Applikation von Kolchizin und erzeugt Ploidiechimären, auch Cytochimären genannt (DERMEN und BAIN, 1944).

3. Chimärisch bedingte Laub- und Blütenblattpattern sind auf GENERATIVEM WEGE nicht erhaltbar. Nachkommen spalten in der Regel der genetischen Situation der L2 (verantwortlich für die Bildung der Gameten) folgend auf. Wegen des heterozygoten Zustandes der Sternmusterpetunie (MEYER et al., 1992) ist eine mendelnde Aufspaltung in rot und weiß blühende Nachkommen zu erwarten. Darunter darf sich - die chimärische Konstitution vorausgesetzt - in direkter Folge kein Sternmuster befinden.

2.2. Die doppelte Markierung der Scheitelschichten

Um Aussagen darüber zu treffen, welche der drei Schichten eines Petuniensproßscheitels sich in welchem Maße an der Bildung von Geweben beteiligt, ist es notwendig, für die Scheitelschichten eine über die gesamte Ontogenese verfolgbare Markierung zu haben. Eine eindeutige Möglichkeit dabei ist die Erhöhung des Ploidiegrades beispielsweise einer Scheitelschicht. Die Applikation des Herbstzeitlosen-Alkaloids Kolchizin: $C_{22}H_{25}O_6N$ (BLAKESLEE und AVERY, 1937/ BLAKESLEE et al., 1940) bewirkt bei der Mitose die Inaktivierung des Spindelapparates, in deren Folge es zu einem erhöhten Chromosomensatz (Genommutation) kommen kann. Je nachdem, ob homologe oder nichthomologe Chromosomensätze verdoppelt wurden, spricht man von Auto- bzw. Allopolyploidie (STRASBURGER et al., 1989). Vielfach bereits angewendet ist eine Methode, bei der mit Kolchizin getränkte Watte auf die Vegetationskegel aufgelegt wird (RIEGER, 1963/ KUCKUCK et al., 1989/ SCHMALZ, 1989). Eigenen Erfahrungen mit *Gerbera - Jamesonii* - Hybriden zufolge fanden Lösungen von 0,1 und 0,2%iger Konzentration Verwendung

(OLBRICHT und WEGNER, 1991). Dieser Behandlung unterzogen wurde der beschriebene Sternmustertyp. Die Selektion nach der Applikation erfolgte zunächst auf visueller Basis (veränderter Phänotyp). Eingehend untersucht wurden daraufhin diese Pflanzen mit verschiedenen Methoden der Ploidiebestimmung.

2.3. Methoden der Ploidiebestimmung

• Qualitative Untersuchungen

Auf der qualitativen Ebene wurden ausgehend vom unterschiedlichen Phänotyp (Blüten) der Varianten Zellgrößen gegenübergestellt, sowie Unterschiede in den Zellformen untersucht. Eingebunden darin sind visuelle Vergleiche der Zellkerngrößen. Dazu sind von Petalen Frischpräparate (Petalensegmente, Epidermisabzüge) angefertigt und entlüftet worden. Querschnitte sind sehr schwer herzustellen. Es empfiehlt sich dafür der Schnitt in Zucchini bzw. wassergetränktem Holundermark. Auf diese Weise bleibt das empfindliche Kronblattgewebe schadlos. Ausgelöste Plasmolyse (Entlüftung in 10%iger KNO₃-Lösung) erleichtert die Zuordnung der Vakuolenfarbstoffe zu den Zellen. Einfacher hingegen können Petalensegmente aufgrund ihrer geringen Mächtigkeit am Mikroskop durchleuchtet werden. Für den Vergleich der Kerngrößen wurden Frischpräparate entlüftet, in Karminessigsäure gelegt, nach zwei Stunden in Wasser gespült und untersucht. Kerngrößenvergleiche sind ebenfalls in den Kunststoffpräparaten - hier im histogenetischen Zusammenhang - gut möglich.

• Stomatamessung

Eine der gebräuchlichsten Indiziensammlungen zur indirekten Bestimmung des Ploidiegrades ist die Messung der Größe von Schließzellen. Dabei sollte auf eine bei jeder Messung gleiche Entnahmestelle am Laubblatt (Interkostalfeld) und die ähnliche Konstitution der Pflanzen (Alter, Gesundheits- und Ernährungszustand, gleiche Position des untersuchten Laubblattes) geachtet werden (SCHWANITZ, 1952/ ADANIYA und ARDIAN, 1994). Die Erfassung von Stomatameßwerten gilt mit einer ausreichend großen Stichprobe (in dieser Untersuchung 200 Werte pro Variante) als sicheres Mittel zu einer relativen Aussage über den Ploidiegrad der ersten Scheitelschicht einer Pflanze, da die Epidermis ein L1-bürtiges Gewebe ist. Abzüge der unteren Laubblattepidermis wurden demzufolge mikroskopiert, die Stomatalänge mit einem Meßokular bestimmt. Über den

$$\text{Umrechnungsfaktor} = \frac{\text{Anzahl der Objektmikrometerintervalle} \times \text{Intervallgröße}}{\text{Anzahl der Okularmikrometerintervalle}}$$

(im vorliegenden Fall 1,5) findet man zur wahren Länge der Schließzellen (in μm). Eine statistische Aufarbeitung der Meßdaten läßt Schlüsse auf den Ploidiegrad zu. Zur Untersuchung kamen alle auf der Farbtafel II verzeichneten Varianten.

- **Zellenzählung Epidermis/Kronblatt**

Da sich in der Regel erhöhte Ploidiegrade in größeren Zellen äußern (SCHMALZ, 1989) wurden für die zu vergleichenden Varianten (Farbtafel II) die Anzahl der Zellen pro Fläche (Petalenepidermen) ermittelt. Dabei muß analog zur Stomatamessung auf die adäquate Entnahmestelle, den Ernährungszustand und das Alter der Pflanze geachtet werden. Auf 34 (pro Variante) 8,8cm x 13cm großen Photos konnten die Zellen ausgezählt werden. Eine begleitende Skalenphotographie garantiert die Maßstäblichkeit und ermöglicht eine Aussage zum durchschnittlichen Flächeninhalt einer oberen bzw. unteren Epidermiszelle in μm^2 . Die über das Längenverhältnis Objekt (Skala) zu Photo ermittelte Endvergrößerung liegt ungefähr bei dem Faktor 307. Eine Kontrollberechnung über das Mikroskop (Objektiv einschließlich Ausschnitt) und die Vergrößerung von Photonegativ zu -positiv ergab den Vergrößerungsfaktor 297 (BEYER und RIESENBERG, 1988). Aufgrund zu erwartender Abweichung (u.a. Linealmessung) liegt die tatsächliche Vergrößerung wahrscheinlich zwischen beiden Werten. Die ermittelten Daten wurden statistischen Tests unterzogen. Weitere Untersuchungen widmen sich den Auswirkungen von Plasmolyse auf die Meßergebnisse. Durch Entlüften von Epidermisabzügen in 10%iger Kaliumnitratlösung (KNO_3 -Lösung) wurde die Plasmolyse von Epidermiszellen ausgelöst.

- **Anzahl der Nucleoli**

Über die Anzahl der Kernkörperchen lassen sich Rückschlüsse direkt auf den Ploidiegrad ziehen. In der Literatur ist eine Möglichkeit der Sichtbarmachung von Kernkörperchen von ADANIYA und ARDIAN (1994) beschrieben. Dabei werden die Nucleoli über eine Silbernitratbehandlung sicht- und zählbar, ihre maximale Anzahl pro Zellkern gibt Aufschluß über die Ploidiestufe. In der vorliegenden Arbeit konnten die Nucleoli im Ergebnis der Kunststoffeinbettung und Anfärbung mit Toluidin sehr gut sichtbar gemacht und zur Ploidiebestimmung herangezogen werden.

- **Chromosomenzählung**

Herkömmliche Methoden zur Chromosomenzählung wie die Färbevarianten mit Karmin-essigsäure bzw. Hämatoxylin als Wurzelspitzen-Quetschpräparate (DARLINGTON und LA

COUR, 1963/ ROMEIS, 1989/ KAMO und GRIESBACH, 1993) führten auch bei vorheriger Stauchung in 0,1%iger Kolchizinlösung (1h) zu keinen brauchbaren Ergebnissen. Offenbar sind die Wurzelspitzen sehr hart, so daß diese Methode nicht weiter Verwendung fand. Als sichere Untersuchungsmöglichkeit erwies sich die Kunststoffeinfbettung von am Mittag bei Sonne entnommenen Explantaten (Blüten und Sproßspitzen), die nach dem Schnitt mit einer Dicke von 8 µm mit Toluidin angefärbt wurden. In allen Gewebeteilen - auch in den Antheren (hier meiotische Teilungen) - ist der gesamte Teilungszyklus sichtbar; Zellteilungen können im Stadium der Metaphase gut zählbare Chromosomen erbringen.

2.4. Herstellung von Dauerpräparaten

Zur histologischen Untersuchung wurden mit dem Ziel, auswertbare Schnitte von Sproßscheiteln und Blüten zu erhalten, Sproßspitzen zur Einbettung in Paraffin und Kunststoff gebracht. Prinzipiell sind beide Methoden erfolgversprechend. Aufgrund der in diesem Fall erzielten besseren Qualität bei den Kunststoffschnitten wurde diese Form der Präparation favorisiert, auch weil hier Kernkörperchen- und Chromosomenzählungen besser möglich sind.

- **Einbettung in Paraffin:**

In Carnoy'scher Lösung infiltrierte Objekte verbleiben für zwei Tage in dieser Lösung und werden anschließend über eine Alkoholreihe entwässert. Die Vorbereitung zur Einbettung in Paraffin erfolgt mit Propanol/Rotihistol. Nach dem Schnitt der Blöcke am Mikrotom (Schnittdicke 8 µm) werden die Präparate mit Hämalaun und Eosin angefärbt und unter Verwendung von Kanadabalsam und Deckgläsern eingedeckelt.

- **Einbettung in Kunststoff:**

Auch bei der Kunststoffeinfbettung werden die Präparate zunächst in Carnoy'scher Lösung entlüftet, bevor sie in dieser Lösung für 24 h fixiert werden. Die Entwässerung erfolgt hier über eine Reihe von Ethylenglycolmonoethylether, Ethanol, Propanol und Butanol. Zum Einbetten ist eine Vorbereitungslösung (100 ml Technovit 7100 und 1g Härter 1) für 24 h und anschließend eine Lösung aus 20 ml Vorbereitungslösung und 2 ml Härter 2 erforderlich. Letzterer Schritt dient der Polymerisation, die nach 24 h abgeschlossen ist. Sind die Trägerblöcke befestigt, kann mit dem Schnitt am Mikrotom (Schnittdicke 8 µm) begonnen und anschließend mit Toluidin gefärbt werden. Nach dem Eindeckeln mit 'DPX Mountant for histology' (Fluka) stehen die so hergestellten Präparate zur Ansicht bereit.

2.5. in-vitro-Kalluskultur

Um das Entmischungs- und Regenerationsverhalten vor allem der das Sternmuster zeigenden Petunien zu untersuchen, wurden einzelne Varianten in eine Kalluskultur überführt. Die von Stern/DDD, TDD, TTT und von rot/tetra aus den Interkostalfeldern der Laubblätter entnommenen Explantate sind nach Desinfektion (70 %iger Alkohol und 0,25 %iges Wofasteril) auf ein Kallusmedium (1/2 MS + 1mg IES/l + 1mg BAP/l) gebracht worden. Eine rasche Kallusentwicklung zeigte in der Folge nach durchschnittlich vier Wochen erste Sproßentwicklung. Die Sprosse wurden abgenommen und auf ein um die Hälfte der Nährstoffkonzentration verringertes Nährmedium nach MURASHIGE und SKOOG (1962) übertragen. Nach erfolgter Wurzelbildung und Sproßwachstum kamen die Pflanzen zur Überführung in Erdkultur, wo sie bis zur Bonitur der Blüte kultiviert wurden.

- **Versuch zur Kallusregeneration von Petalensegmenten**

Um die Ursachen partnerinduktiver Wirkungen zu untersuchen, wurden Petalensegmente aus den bereits rot gefärbten Teilen einer noch nicht geöffneten Blüte der Ploidiechimäre Stern/TDD entnommen. Die der beschriebenen Kalluskultur von Laubblattexplantaten analoge Verfahrensweise führte zwar zu ausreichender Kallusbildung, brachte aber keine Sproßbildung. Deshalb wurde mit verschiedenen Nährmedien, denen auf der Basis von 1/2 MS unterschiedliche Mengen an IES, IBA, 2,4 D, 2iP und Kinetin beigelegt waren, weiterexperimentiert. Alle Versuche fanden im klimatisierten Kulturraum bzw. in Klimaschränken unter Dauer-Kunstlicht (ausgenommen die Kallusphase) und bei ca. 22°C statt.

2.6. Untersuchungen zur Stabilität des A1-Gens

- **Bonitur im Bestand**

Dazu wurden zwei Klonbestände aus weißblühenden Kallusregeneraten von Stern/DDD und Stern/TDD aufgebaut und über sechs Monate hinsichtlich ihrer Blütenfarbe bonitiert. Da die Spreizung der Blüten quantitativ schwer erfaßbar und die Fähigkeit dieser Pflanzen, den Sternmustertyp wieder zu bilden, bekannt war, wurde die Anzahl dieser erneuten Sternausprägung (an vormals weiß blühenden Pflanzen!) registriert.

- **Kreuzungsanalysen**

Zur Überprüfung des Merkmals rote bzw. weiße Blütenfarbe und damit auch der Stabilität des A1-Gens wurden Selbstungen der Sterne DDD, TDD und TTT sowie der weiß bzw. rot

blühenden diploiden und tetraploiden Varianten durchgeführt. Ziel war es desweiteren, homozygote Pflanzen in bezug auf die Blütenfarbe zu erhalten. Im Rahmen der Analyse zur Genstabilität kam es zur Kreuzung heterozygoter, transgener Pflanzen (rot/diploid aus Stern/TDD) mit der als F1-Hybride ausgezeichneten Petuniensorte 'Marathon Dunkelblau' (Firma Walz). Eine Überprüfung des F1-Status' der Blütenfarbe durch eine Selbstung dieser Sorte erwies sich als notwendig. Die Samen wurden jeweils nach der Ernte ca. drei Monate gelagert, weil sich bei *Petunia* die Keimfähigkeit mit zunehmender Lagerungsdauer bis zu sechs Monaten erhöht (RÜNGER, 1976).

2.7. Technische Ausrüstungen

- Mikroskope 'Jenaval' / 'Laboval' einschließlich Photoeinrichtung
- Mikrotom Leica 'RM 2155' / Laboreinrichtung zu histologischen Untersuchungen (Paraffin- und Kunststoffpräparation)
- Photoapparat 'Praktika' BX20s mit Tele- und Nahobjektiv
- Vakuumpumpe
- Laboreinrichtung in-vitro-Kultur (einschließlich Klimaraum und Klimaschränken)
- Stereomikroskop 'SV 6' Zeiss/Germany mit angeschlossenem 'Video Cassette Recorder', Model AG 5700, Panasonic und 'Color video Printer/Mavigraph', Sony
- PC mit Software-Programmen wie Microsoft Word, Version 6.0, SPSS für Windows, Version 6.0 und Coral Draw, Version 4.0
- Colour Card of the „Royal Horticultural Society“, 1995

3. Die Ergebnisse und ihre Auswertung

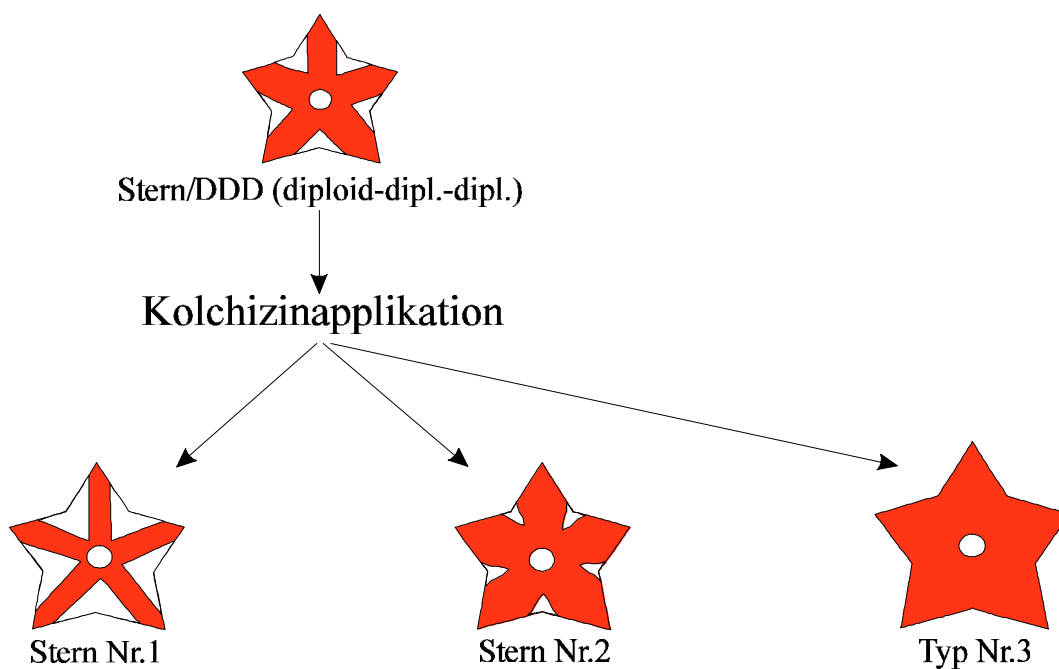
3.1. Kolchizinversuch an Stern/DDD

Ausgangspunkt der Untersuchungen ist der aus dem Freilandversuch stammende Sternmustertyp (MEYER et al., 1992 und mündl. Information). Er wird seines homohistisch diploiden Ploidiegrades zufolge als Stern/DDD bezeichnet. Mit dem Ziel, die Ploidiestufe einer der drei Schichten des Petunien-Sproßscheitels zu erhöhen, wurde eine Kolchizinapplikation vorgenommen. Drei Typen, die sich im Phänotyp ihrer Blüten auffällig von Stern/DDD unterscheiden, konnten selektiert und, ausgenommen Stern Nr.2, als Klonbestand erhalten werden:

Stern Nr.1: stark vergrößerte weiße Sektoren, Blüten etwas größer als Stern/DDD

Stern Nr.2: auffällig verkleinerte weiße Sektoren, Blüten etwas größer als Stern/DDD

Typ Nr.3: einheitlich rote, sehr große Blüten, besonders intensiver Farbton



3.2. Mikroskopische Untersuchungen / Ploidienachweise

Im Vordergrund steht zunächst eine mikroskopische Analyse von Stern/DDD und Stern Nr.1. Für Rückschlüsse auf den Ploidiegrad der ersten Scheitelschicht gilt die Messung der Schließzellengröße als brauchbare Variante (SCHWANITZ, 1952/ SANTOS und HANDRO, 1983/ NAPP-ZINN, 1984 und 1988/ OLBRICHT und WEGNER, 1991).

Bereits auf der qualitativen Ebene sind Größenunterschiede deutlich erkennbar:

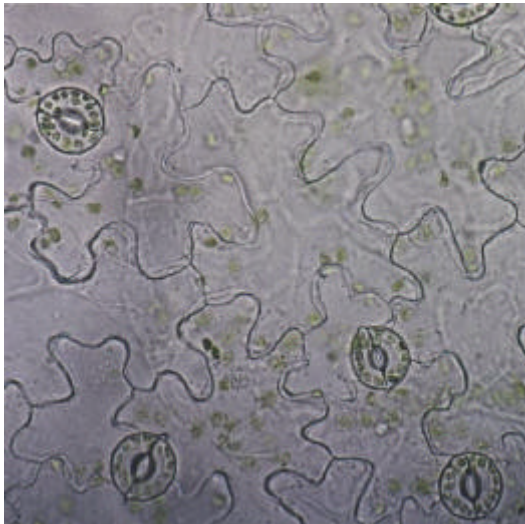


Abb.9: Stomata Stern/DDD

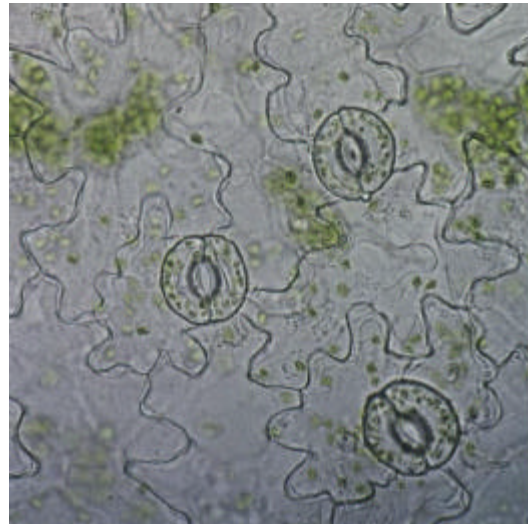
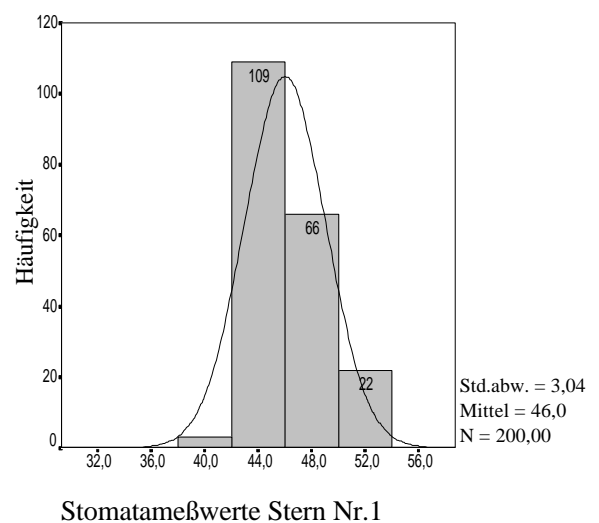
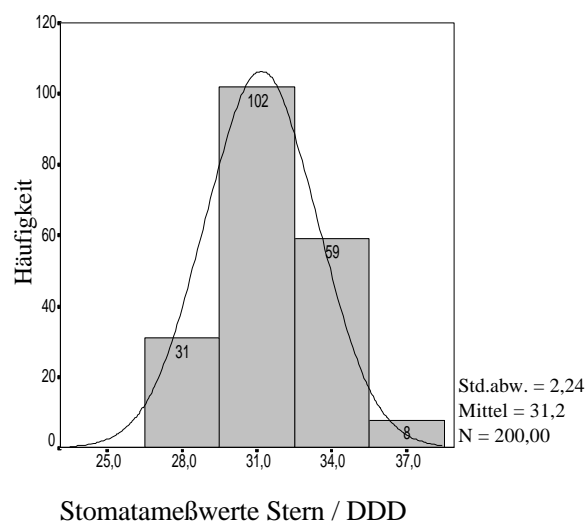
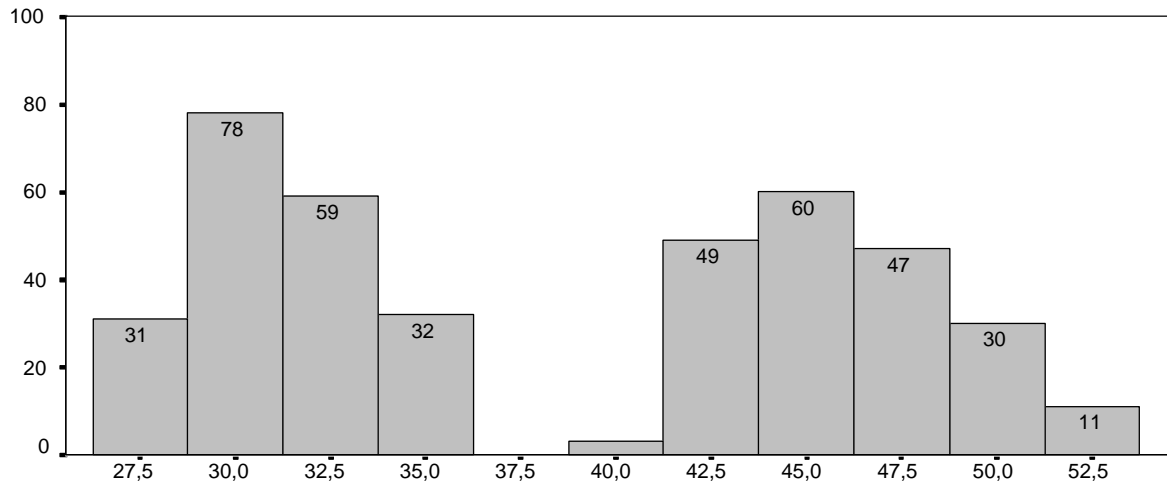


Abb.10: Stomata Stern Nr.1

Um diese Beobachtung statistisch zu belegen, wurden pro Variante 200 Stomatallängenwerte (in μm) erfasst, aufgearbeitet und einem Mittelwertvergleich unterzogen:



In einem gemeinsamen Diagramm dargestellt zeigen sich die gut voneinander getrennten und jeweils einer Normalverteilung sich nähernden Häufigkeitsverteilungen im Vergleich wie folgt (Abszissenachse mit den Stomatalängen in μm):



Vergleich Häufigkeiten Stomatameßwerte Stern/DDD (links) und Stern Nr.1

Der T-Test zum Vergleich beider Stichproben ergab einen signifikanten Unterschied; Stern Nr.1 besitzt signifikant größere Schließzellen als Stern/DDD. Es kann hiermit die Vermutung einer polyploiden Epidermis für Stern Nr.1 bestätigt werden. Die Proportion zwischen den Stomata-Mittelwerten beider Sterne beträgt 1:1,4. RIEGER (1963) führt für das Größenverhältnis von diploiden zu tetraploiden Zellen Werte von 1:1,2 bis 1:1,4 an. Eine tetraploide Epidermis ist damit für Stern Nr.1 wahrscheinlich, eine eindeutige Aussage kann jedoch erst nach einer Chromosomenzählung getroffen werden. In gleicher Weise Unterschiede in den Epidermen der Petalen zu finden, liegt auf der Hand. Auch hierfür zunächst eine qualitative Gegenüberstellung: Auffällig sind zudem die verschiedenen Zellränder der Epidermiszellen; bei Stern Nr.1 erscheinen sie stärker gefaltet (alle Präparate mit Plasmolyse: Entlüftung in KNO_3 -Lösung, Aufnahmen mit gleicher Vergrößerung).

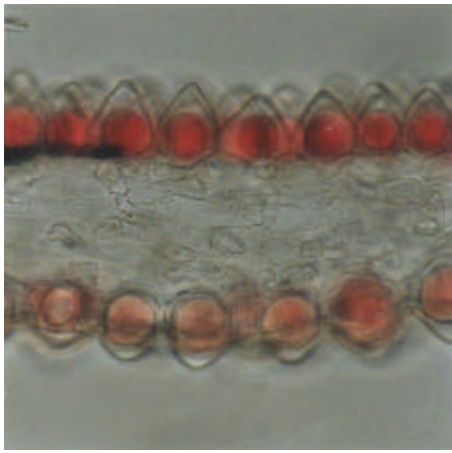


Abb.11: Petalenquerschnitt
(rotes Binnenfeld) Stern/DDD

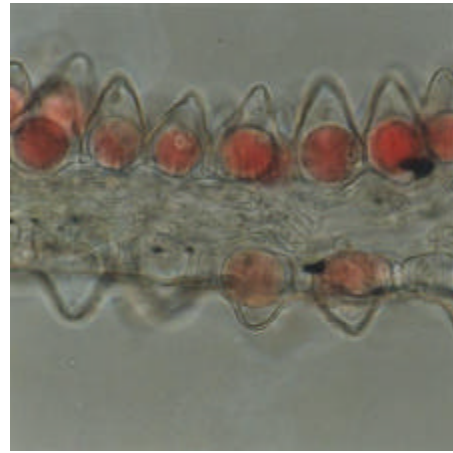


Abb.12: Petalenquerschnitt
(rotes Binnenfeld) Stern Nr.1

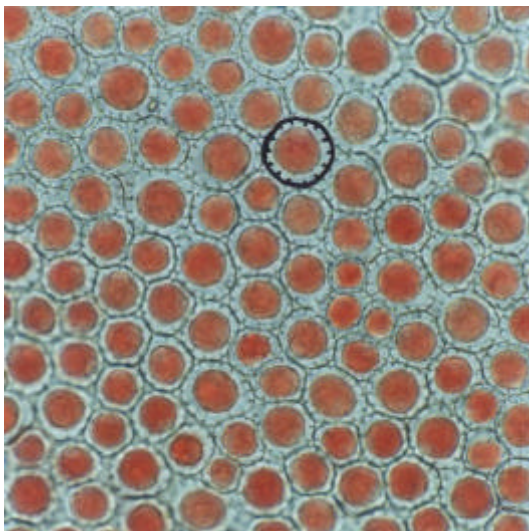


Abb.13: obere Epidermis
(rotes Binnenfeld) Stern/DDD

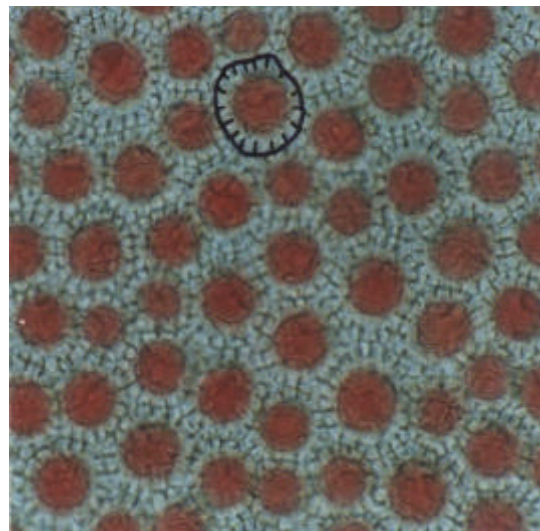


Abb.14: obere Epidermis
(rotes Binnenfeld) Stern Nr.1

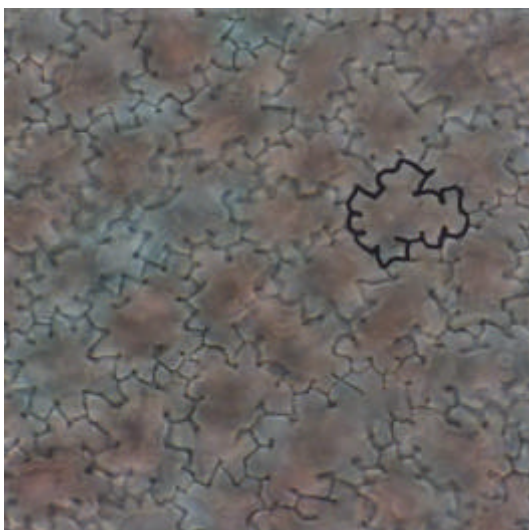


Abb.15: untere Epidermis
(rotes Binnenfeld) Stern/DDD

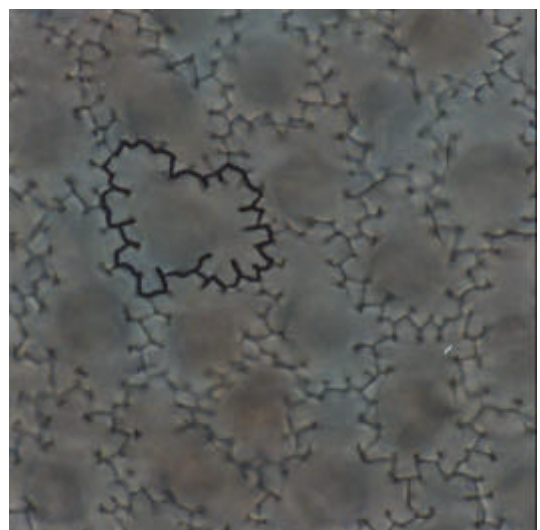


Abb.16: untere Epidermis
(rotes Binnenfeld) Stern Nr.1

Um hier quantitativ das Beobachtete abzusichern, wurde eine photographische Methode geprüft, die Zellenanzahl pro Fläche zu erfassen und miteinander zu vergleichen. Die jeweils 34 Photos der oberen Epidermen ergaben für Stern/DDD durchschnittlich 188 Zellen pro Photo bzw. 101,6 bei Stern Nr.1. Eine mitphotographierte Skala diente zur Garantie der Maßstäblichkeit und zur Berechnung der wahren Flächeninhalte. Demzufolge hat eine obere Epidermiszelle von Stern/DDD einen durchschnittlichen Flächeninhalt von $645 \mu\text{m}^2$, die von Stern Nr.1 einen von $1194 \mu\text{m}^2$. Beide Varianten unterscheiden sich damit voneinander.

Die Epidermen für diese Messungen wurden generell dem roten Binnenfeld mittig entnommen, um eventuell lagebedingte Unterschiede auszuschließen.

Auch für untere Epidermen und Epidermisexplantate, die einheitlich aus dem weißen Petalenrand entnommen werden, ergeben sich analog zu dem Zahlenbeispiel für die obere Epidermis auffällige Unterschiede. Zwischen weißem Rand und rotem Binnenfeld der Petale bestehen ebenfalls Unterschiede (Prüfung an Stern/DDD: siehe auch **3.4.**), so daß die Wichtigkeit einer adäquaten Entnahmestelle (Binnenfeld *oder* Rand) der zum Vergleich herangezogenen Varianten belegt ist.

Desweiteren sollte darauf geachtet werden, daß entweder nur plasmolysierte Proben oder solche ohne Plasmolyse verwendet werden. Plasmolyse verändert bekanntermaßen nicht nur die Vakuolenform, sondern auch die Größe der Zelle (VOGEL und ANGERMANN, 1979/STRASBURGER et al., 1989). Die Zellenanzahl auf jeweils 34 Photos ergab im Falle der weißen Randepidermis (oben) von Stern/DDD ohne Plasmolyse durchschnittlich 179 Zellen pro Photo, 207 hingegen bei vergleichbaren Proben mit Plasmolyse. Auch stieg bei Plasmolyse die Standardabweichung auf Werte um 17! Dies könnte seine Ursache darin haben, daß bei Plasmolyse auch der Zellverband Schaden nimmt, Druck beim Herstellen der Präparate das Gefüge verschieben kann.

Ein Epidermenvergleich der Petalen mittels Zellenanzahl/Fläche erbrachte im vorliegenden Fall das gleiche Ergebnis wie die Ploidiebestimmung zur ersten Scheitelschicht über Stomatamessung (Epidermis=L1-bürtig). Die Entnahmestellen an den Petalen sollten dabei unbedingt einander entsprechen. Ebenso ist es ratsam, bei den Untersuchungen auf Plasmolyse zu verzichten, auch wenn dadurch die Zählung geringfügig erschwert wird. Statistisch konnten aufgrund der hohen Standardabweichungen (ca. 2 bis 12!) keine Aussagen gemacht werden. Die Anwendung der „Drei-Sigma-Regel“ ($x-3s$ - $x+3s$), die Intervalle ergibt, in denen sich 99,73% aller zu erwartenden Werte befinden (RASCH, 1988), macht bereits die Unmöglichkeit einer statistischen Auswertung aufgrund der hohen Standardabweichungen anschaulich. Nur wenig liegen die Intervalle jeweils zu vergleichender Stichproben

gegeneinander verschoben. Lediglich reine Zahlenvergleiche sind bei dieser Variante der Ploidiebestimmung möglich und aussagekräftig.

- **Untersuchungen zu den Zellkerngrößen**

Eine qualitativ eindeutige Unterscheidung ermöglicht die Gegenüberstellung der Zellkerne von Stern/DDD und Stern Nr.1, hier anhand der Petalenepidermen (im Übergang weiß/rot entnommen, alle Aufnahmen mit gleichen Vergrößerungen):

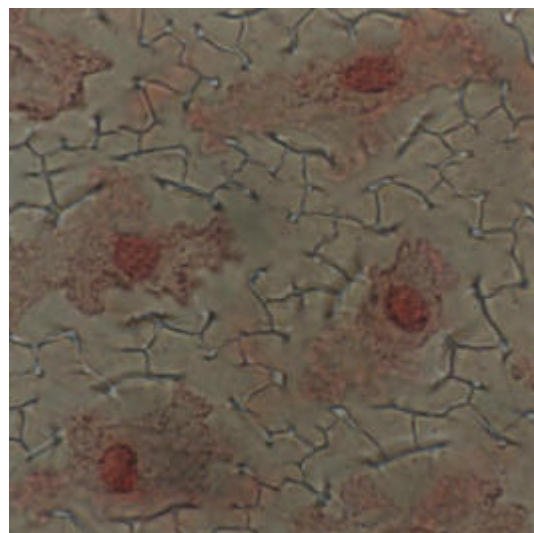
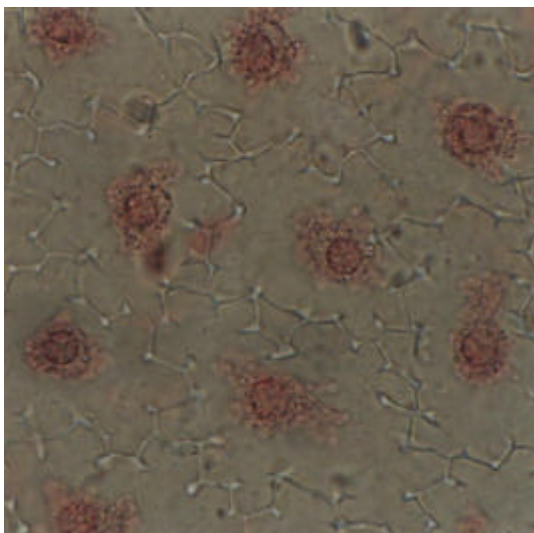
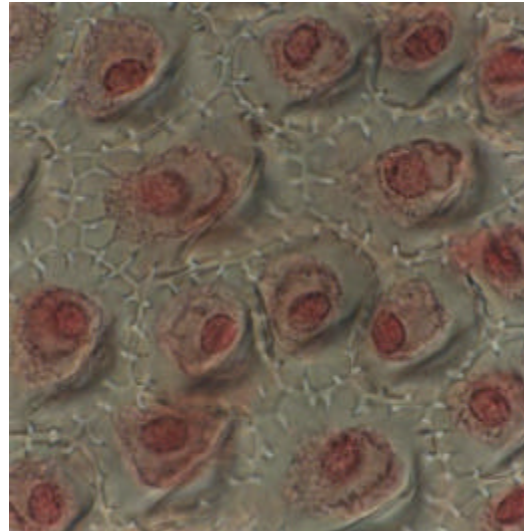
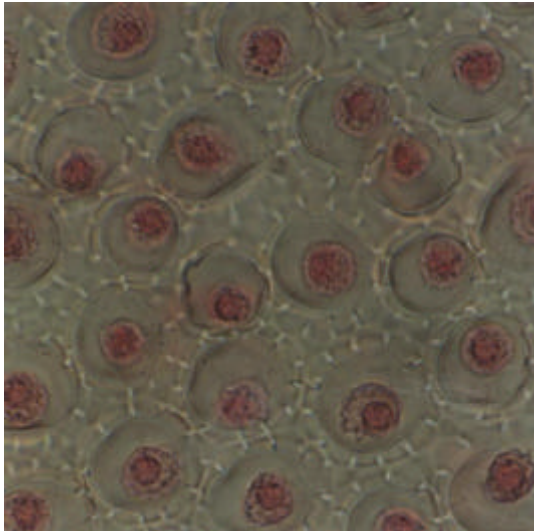


Abb.17: obere und untere Petalen-epidermis Stern/DDD, angefärbt mit Karmin-Essigsäure

Abb.18: obere und untere Petalen-epidermis Stern Nr.1, angefärbt mit Karmin-Essigsäure

Zellkerngrößen in Sproßscheitel und Petalen

Aufschlußreich sind Zellkerngrößenvergleiche im histogenetischen Zusammenhang. Dauerpräparate ermöglichen eine qualitative Aussage über Ploidiestufen einzelner Schichten sowie deren Beteiligung am Aufbau der Gewebe:

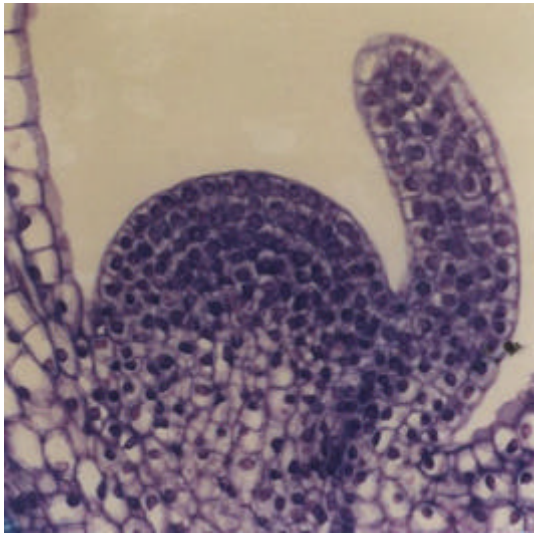


Abb.19: Sproßscheitellängsschnitt
Stern/DDD (in Kunststoff)

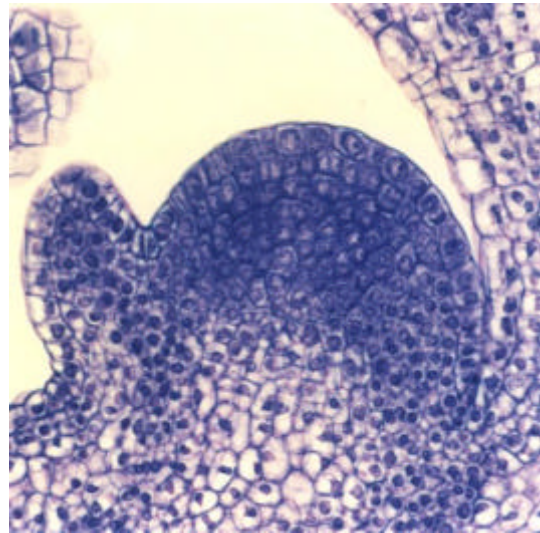


Abb.20: Sproßscheitellängsschnitt
Stern Nr.1 (in Kunststoff)

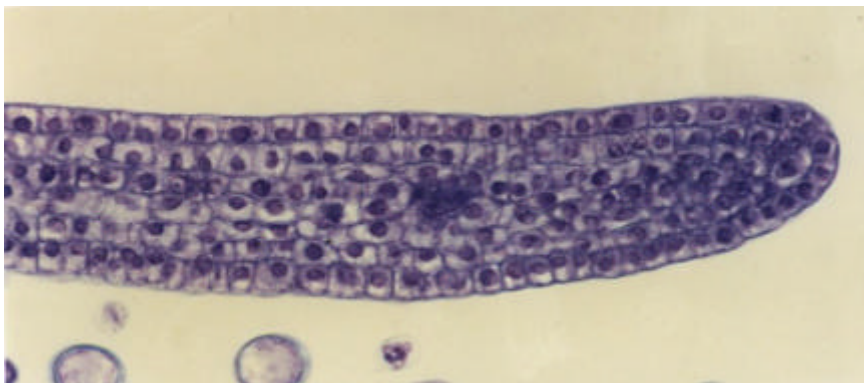


Abb.21:
Petalenquerschnitt
Stern/DDD
(in Kunststoff)

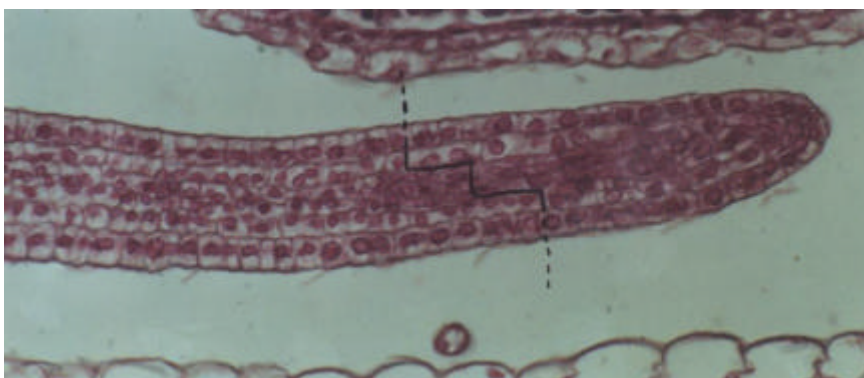


Abb.22:
Petalenquerschnitt
Stern Nr.1
(in Paraffin)
(---- ————— ----
Ploidiegrenze)

Während bei Stern/DDD alle Zellkerne gleiche Größe aufweisen, besitzt die L1 bei Stern Nr.1 auffällig größere Zellkerne im Vergleich zur zweiten Tunica- (L2) und zur Corpusschicht (L3). In einer Zelle von L1 (mittig) sind drei Nucleoli zählbar (Hinweis auf Tetraploidie dieser Scheitelschicht). Durch das Mesophyll der Petalen bei Stern Nr.1 verläuft am Rand eine Ploidiegrenze. Hier ist die Beteiligung der L1 (höherploid) am Mesophyll des Petalenrandes eindeutig ablesbar. Die **Hypothese 2** ist bewiesen.

Petalenmesophyll

Im Frischpräparat bestätigt sich dieses histologische Bild: Während bei Stern/DDD mit dem Übergang vom weißen zum roten Bereich (Epidermen) der Ploidiegrad im Petalenmesophyll unverändert bleibt, gibt es mit dieser Farbgenze einen deutlich sichtbaren Wechsel in der Zellgröße im Mesophyll der Petalen bei Stern Nr.1



Abb.23: Petalenmesophyll im Übergangsbereich von rot zu weiß, Stern/DDD (Aufsicht)



Abb.24: Petalenmesophyll im Übergangsbereich von rot zu weiß, Stern Nr.1 (Aufsicht)

Neben der Beteiligung der L1 am Rand der Petale kann mit diesen Bildern die **Hypothese 1**, daß die L1 Träger des Farbdefektes ist, bestätigt werden, da erst mit der Unterlagerung der epidermalen Gewebe durch intaktes (L2-bürtiges) Mesophyll eine Farbbildung in den Epidermen (Partnerinduktion) möglich wird (**Hypothese 3**). Der homo-histische Petalenrand (weil alleinig von L1 abstammend) hingegen bleibt weiß und ist bei Stern Nr.1 zusätzlich polyploid.

Chromosomenbeleg

Für einen eindeutigen und endgültigen Beleg für den Ploidiegrad müssen entsprechende Chromosomenzahlen gefunden werden. Durch die Einbettung von Sproßspitzen und Blüten mit gerade in Teilung befindlichen Zellen in Kunststoff waren Chromosomen sicht- und in Fällen der Metaphase auch zählbar. Ausgehend davon, daß L1 epidermales Gewebe, L2 subepidermale (sowie die Gameten) und L3 u.a. Gewebe von Leitungsbahnen bildet (BERGANN, 1954/1955 / NAPP-ZINN, 1988), können über ausdifferenzierte Gewebe Rückschlüsse auf den Ploidiegrad der drei Scheitelschichten gezogen werden. Für die beiden Sterne soll das hier demonstriert werden:

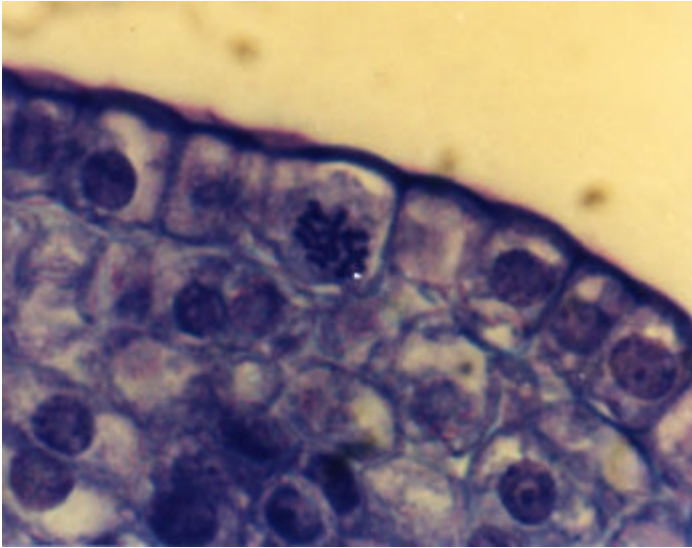
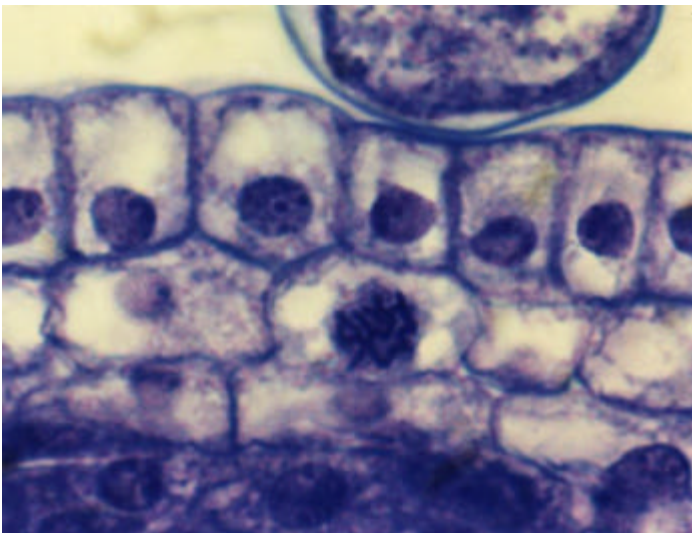
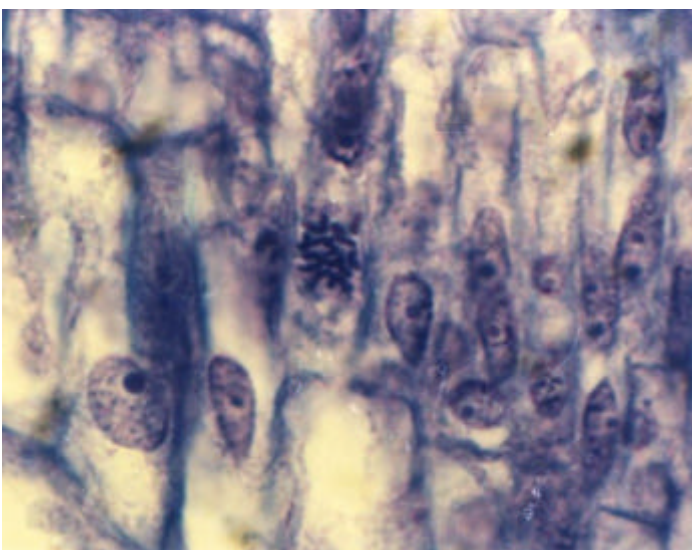


Abb.25:
Chromosomenbelege Stern/DDD
für
L1-bürtiges
(14 Chromosomen in
Petalenepidermis zählbar),



L2-bürtiges
(14 Chromosomen in
subepidermalem Petalengewebe
zählbar)
und



L3-bürtiges Gewebe
(13 Chromosomen in
Blütenstielmitte zählbar,
Abweichung von Sollzahl
methodisch bedingt),
Kunststoffeinbettung

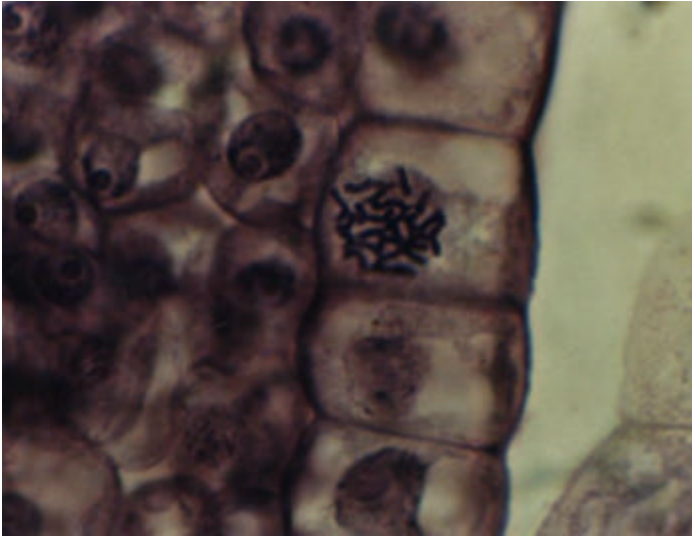
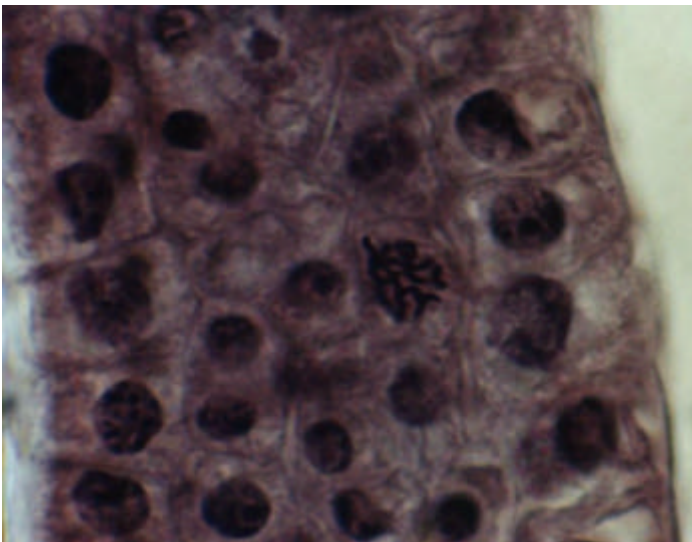
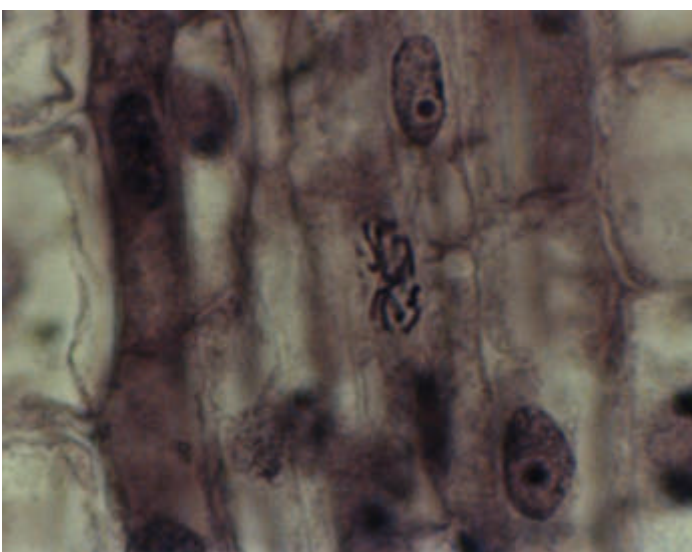


Abb.26:
Chromosomenbelege Stern Nr.1
für
L1-bürtiges,
(28 Chromosomen in
Petalenepidermis zählbar),



L2-bürtiges
(14 Chromosomen in
subepidermalem Petalengewebe
zählbar)
und



L3-bürtiges Gewebe
(12 Chromosomen in
Blütenstiellmitte zählbar,
Abweichung von Sollzahl
methodisch bedingt),
Kunststoffeinbettung

In allen von den drei Scheitelschichten abstammenden Geweben können bei Stern/DDD maximal 14 Chromosomen, bei Stern Nr.1 in L1-bürtigem Gewebe (Epidermen und Randmesophyll der Laub-, Kelch- und Kronblätter) max. 28, in den von L2 und L3 abstammenden Geweben max. 14 Chromosomen gezählt werden. Damit ist die Konstitution beider Sterne in bezug auf ihre Ploidiestufen endgültig charakterisiert. Stern Nr.1 ist eine Ploidiechimäre mit der Schichtung tetraploid (L1) - diploid (L2) - diploid (L3) und wird fortan als Stern/TDD bezeichnet. Die farbdefekte L1 ist in diesem Falle gleichzeitig tetraploid. Durch die gekoppelten Merkmale, Farbe und Ploidiestufe, ist die Beteiligung der L1 am Randmesophyll des Kronblattes nachweisbar (**Hypothese 2**).

3.3. Entmischungsvorgänge / in-vitro-Kalluskultur

Im Klonbestand von Stern/DDD entstanden Sproßvarianten, die weiß oder rot blühten. Dieser spontane Vorgang könnte als Entmischung interpretiert werden. Ihn experimentell zu prüfen, war Ausgangspunkt für eine Kalluskultur von Stern/DDD und Stern/TDD. Die Laubblattexplantate zeigten bereits nach 3-4 Wochen gute Kallusbildung mit nachfolgender Sproßentwicklung. Unter den in Erdkultur überführten Pflanzen konnten weiß und rot blühende Petunien, sowie solche mit instabilen Farbbildern (Sprenkelung: als weiß erfaßt) bonitiert werden.

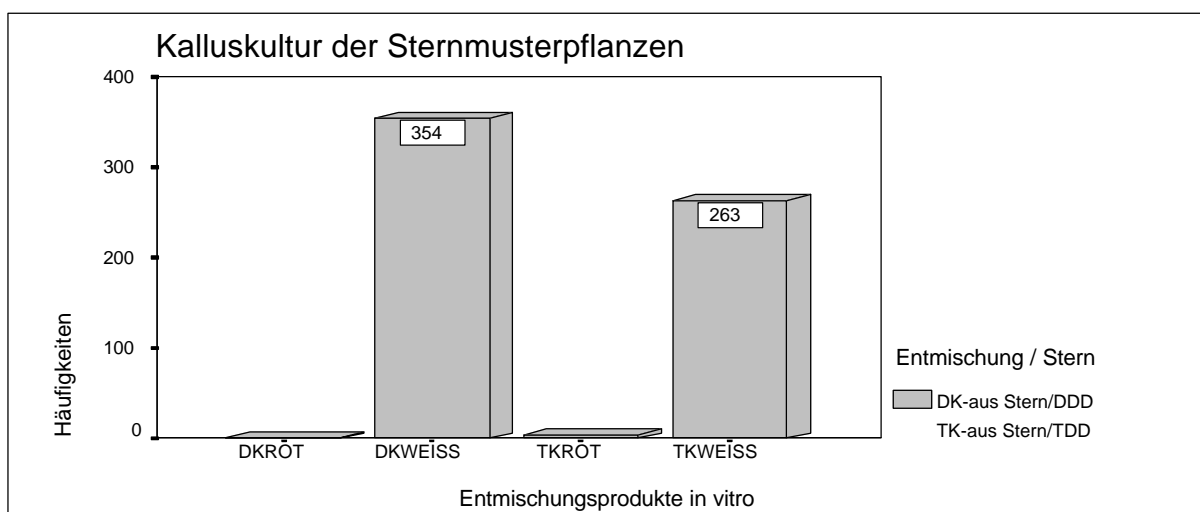


Abb.27:
Stern/DDD (oben)
und Blüten der
Kallusregenerate



Abb.28:
Stern/TDD (oben)
und Blüten der
Kallusregenerate

Rückschlüsse über die Farbe der Regenerate auf ihren histologischen Herkunftsort zu ziehen, liegt auf der Hand, ist aber aufgrund der Instabilität des A1-Gens kein sauberer Analyseweg. Es bleibt wahrscheinlich, daß ein Regenerat von L1-bürtigem, normalerweise „weißem“ Epidermisgewebe durch Deblockade des A1-Gens als rotblühende Pflanze (der farblichen Zuordnung entsprechend L2-bürtig) identifiziert wird. Das Auftreten gesprenkelter Typen unter den Regeneraten deutet auf diese Verwechslungsgefahr hin. Auch an dieser Stelle erweist sich die doppelte Markierung von Scheitelschichten als sicheres Mittel der Identifikation. Der beschriebenen Ploidiemarkierung bei Stern/TDD zufolge müßten alle rot blühenden Regenerate diploid, die weiß blühenden tetraploid sein. In diesem Falle ist die Aussage, von welchem Gewebe ein Regenerat abstammt, mit Sicherheit möglich. Alle Pflanzen wurden bei der Bonitur hinsichtlich ihres Ploidiegrades über die Stomatamessung (siehe 3.4.2.), Chromosomenzählungen und andere Methoden untersucht.



(DK: Regenerat aus Kalluskultur von Stern/DDD,
TK: Regenerat aus Kalluskultur von Stern/TDD)

Für die einzelnen Entmischungsprodukte konnten folgende Ploidienachweise erbracht werden:

- **Entmischungsprodukt weiß/diploid**

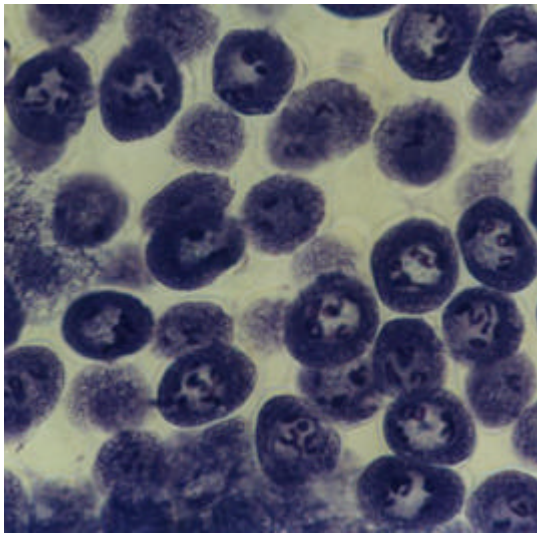


Abb.29: meiotische Zellen in Antheren von weiß/diploid (Kunststoffeinbettung, maximal 7 Chromosomen zählbar)

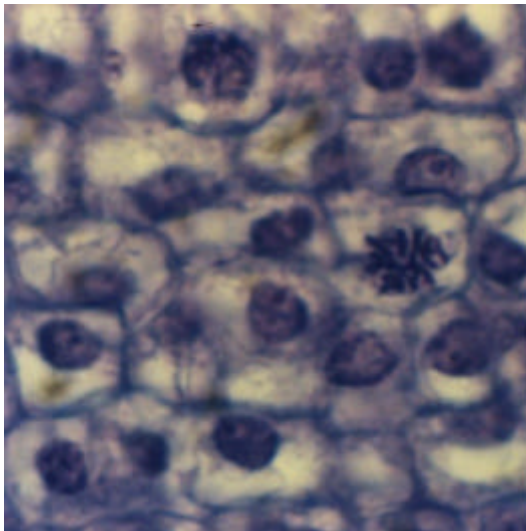


Abb.30: 14 Chromosomen in Petalenepidermis (L1-bürtig) von weiß/diploid (Kunststoffeinbettung)

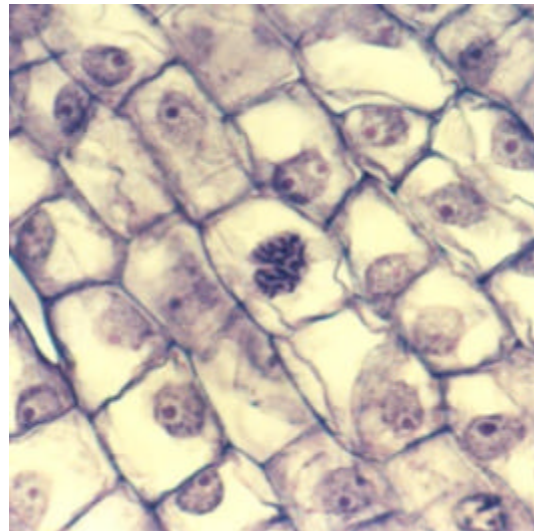


Abb.31: 14 Chromosomen in sub-epidermalem Petalengewebe (im Photo L2-bürtig) von weiß/diploid (Kunststoffeinbettung)



Abb.32: Petalenquerschnitt von weiß/diploid: alle Zellkerne besitzen gleiche Größe (Kunststoffeinbettung)

Das „weiße“ Entmischungsprodukt nach Kalluskultur von Stern/DDD ist diploid und repräsentiert mit hoher Wahrscheinlichkeit die erste Scheitelschicht von Stern/DDD (siehe auch 3.4.2.).

- **Entmischungsprodukt weiß/tetraploid**

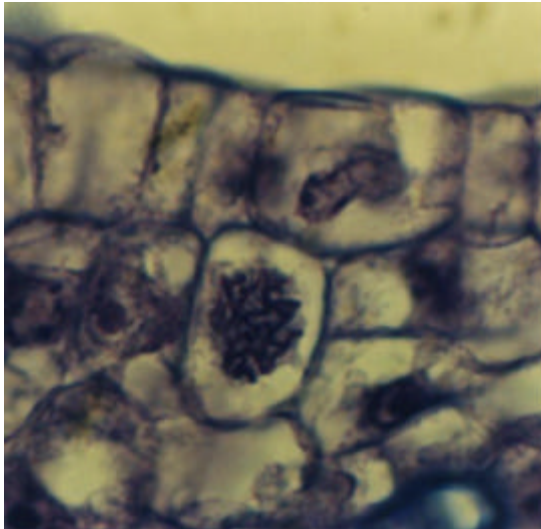


Abb.33: weiß/tetraploid: 26 Chromosomen in subepidermaler Lage (L2-bürtig) zählbar (Abweichung von Sollzahl 28 methodisch bedingt), Petalenquerschnitt in Kunststoff

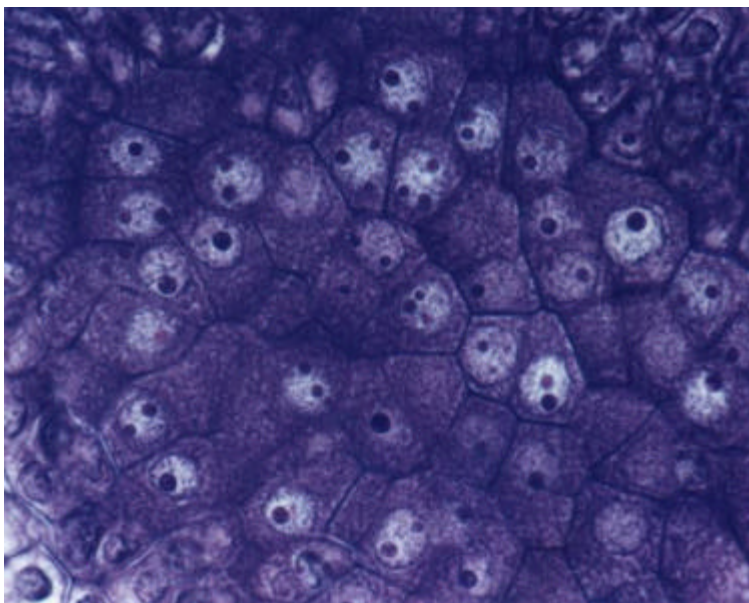


Abb.34: Im Photo sind jeweils maximal 3 Kernkörperchen in der Antherenhülle (L1-bürtig) von weiß/tetraploid zählbar: Hinweis auf Tetraploidie (Abweichung von Sollzahl 4 Nucleoli methodisch bedingt), Kunststoffeinfärbung

Die Ermittlung der Anzahl der Nucleoli ist eine brauchbare und einfache Variante zur quantitativen Ploidiebestimmung. Dabei ist die Anfärbung von Frischpräparaten mit Silbernitrat eine Möglichkeit (ADANIYA und ARDIAN, 1994). Im Zuge der Kunststoffeinfärbungen von Sproßspitzen und Blüten konnten Kernkörperchen nach Färbung mit Toluidin sichtbar gemacht werden. Ihre maximale Anzahl pro Zellkern gibt Aufschluß über die Ploidiestufe.



Abb.35: Petalen-
querschnitt von
weiß/tetraploid: alle
Zellkerne besitzen
gleiche Größe, Kunst-
stoffeinbettung

Das „weiße“ Entmischungsprodukt nach Kalluskultur von Stern/TDD ist tetraploid und repräsentiert aufgrund der Ploidiemarkierung mit hoher Wahrscheinlichkeit die erste Scheitelschicht von Stern/TDD (siehe auch Ergebnisse 3.4.2.).

- **Entmischungsprodukt rot/diploid aus Kalluskultur Stern/TDD**



Abb.36:
Sproßscheitellängsschnitt von
rot/diploid: Zellkerne besitzen
gleiche Größe in allen
Schichten, Kunststoffeinfettung

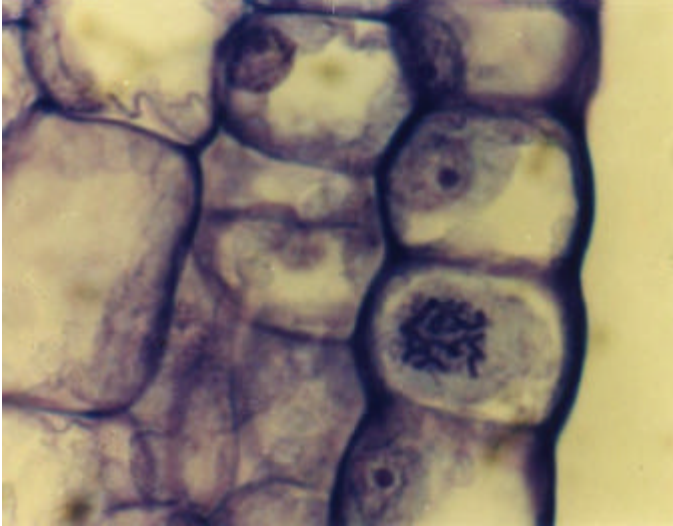
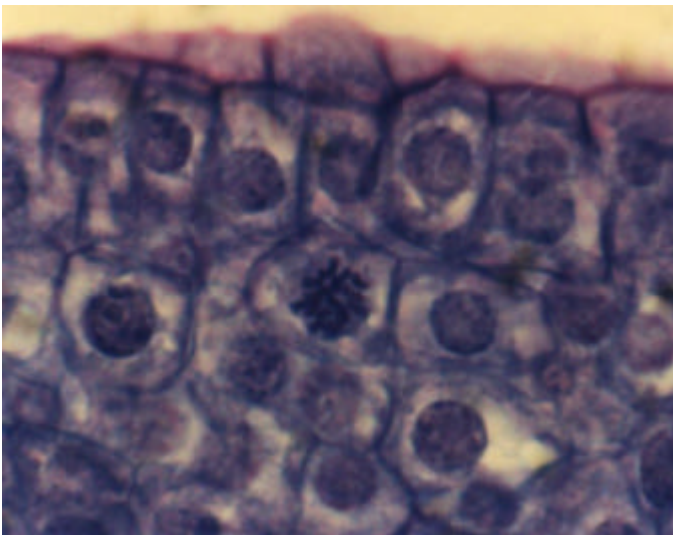
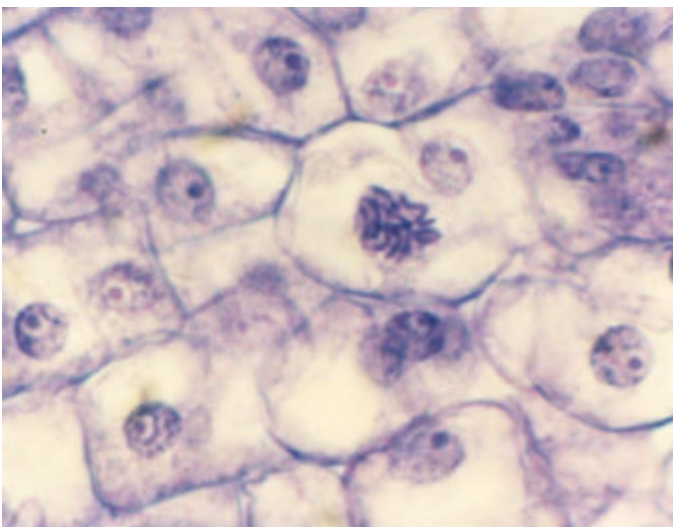


Abb. 37:
Chromosomenbelege
rot/diploid für L1-
bürtige
(Laubblattepidermis),



L2-bürtige
(Laubblatt subepidermal)
und



L3-bürtige
Gewebe
(Blütenstielsmitte),
Kunststoffeinbettung

Nachfolgend sind Ploidienachweise anhand der Nucleoli-Zählungen geführt. Es sind für alle Gewebe maximal zwei Nucleoli pro Zellkern zählbar, was auf einen diploiden Chromosomensatz hindeutet:

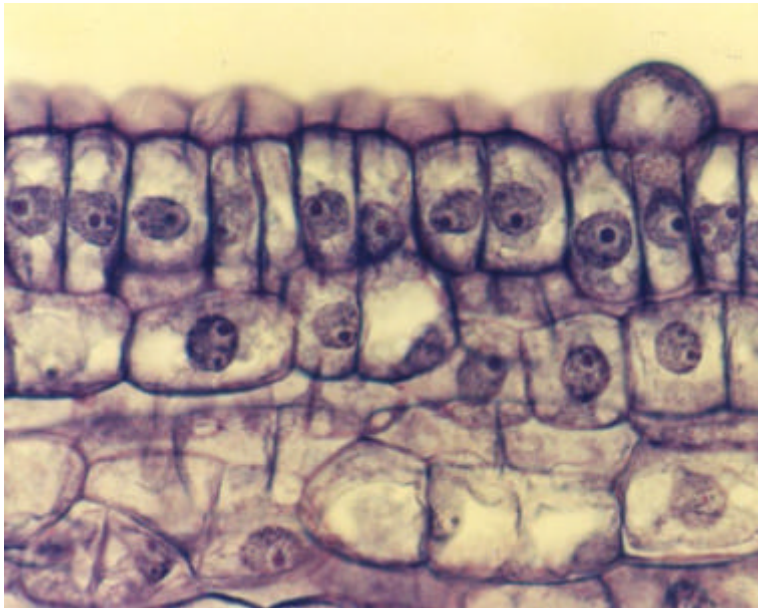
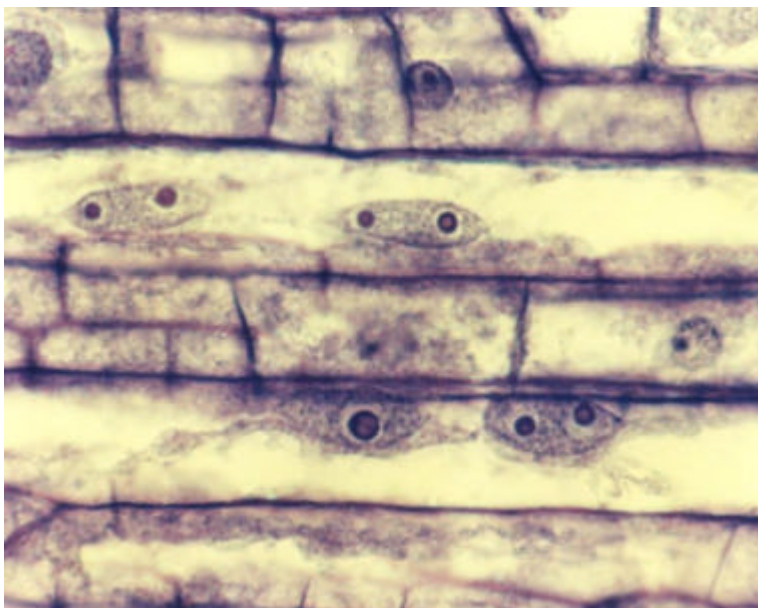


Abb.38: Nucleoli bei
rot/diploid (Blütenstiel) in
⇒ epidermalem
(L1-bürtig),

⇒ subepidermalem
(L2-bürtig)

und



⇒ L3-bürtigem Gewebe
(Gefäß Blütenstielmitte)

Das „rote“ Entmischungsprodukt nach Kalluskultur von Stern/TDD ist diploid. Seiner doppelten Markierung wegen ist als Ursprungsort der Regeneration subepidermales Gewebe (L2- bzw.evtl. L3-bürtig) sicher anzugeben (siehe auch Ergebnisse **3.4.2.**).

BINO et al. (1984) gingen davon aus, daß Kallusregenerate bei *Petunia* in der Regel von Epidermisgewebe abstammen. Die vier roten Regenerate aus der Kalluskultur von Stern/TDD jedoch weisen die mögliche Bildung aus subepidermalen Geweben nach, weil sie gleichzeitig diploid sind. Es sollte dabei bedacht werden, daß entscheidend für das Regenerationsverhalten der Entnahmeort für die Explantate sein kann. Wie aus diesem Versuch hervorgegangene Laubblattvarianten (siehe auch 3.8.) vermuten lassen, gehen die drei Scheitelschichten in dem Maße in die Organbildung ein, daß auch die L1 sich am Laubblattmesophyll beteiligt, was bei Dikotylen relativ selten ist (BERGANN, 1954/55). L3-bürtiges Gewebe ist nur im Binnenfeld des Laubblattes zu finden. Zu dem Versuch verschiedene Ergebnisse könnten erwartet werden, wenn beispielsweise Stengelstücke als Grundlage für die Kalluskultur genutzt würden. Dazu sind, wenn auch statistisch nicht sicher, Ergebnisse aus einem Vorversuch zur Entmischung über Kalluskultur interessant, bei dem Stengelstücke von Stern/TDD verwendet wurden. Von 36 Regeneraten erblühten 34 weiß (tetraploid) und 2 rot (diploid), was einen Anteil „Roter“ von 6% entspricht.

Die Anzahl der roten Entmischungsprodukte bei Kallusregeneration über Laubblattexplantate betrug bei Stern/DDD 1 (= 0,28%), bei Stern/TDD 4 (= 1,5%). Der fünfmal höhere Anteil von Regeneraten aus tieferliegenden Schichten bei Stern/TDD im Vergleich zu Stern/DDD mußte durch erneute Versuchsanstellung überprüft werden, um auch statistisch eine relativ sichere Aussage treffen zu können. Bei dieser zweiten Versuchsanstellung ergaben sich in beiden Fällen nur weiß blühende Regenerate (142 bei Stern/DDD, 112 bei Stern/TDD), so daß sich die statistische Aussage nicht grundlegend verändert. Die Schlußfolgerung, daß diploides Gewebe bei der Kallusbildung tetraploidem Gewebe überlegen ist, erscheint denkbar. Durch die Versuchswiederholung wird auch deutlich, daß die Regeneration aus subepidermalen Geweben bei Kallusregeneration von Laubblattexplantaten ein sehr seltenes Ereignis ist. Möglicherweise werden bei Kultur von Stengelstücken mehr Regenerate von L2/L3-bürtigem Gewebe gebildet als bei Verwendung von Laubblattexplantaten. Für die Sternmusterformen Stern/DDD und Stern/TDD konnte ein für Chimären typisches Entmischungsverhalten nachgewiesen werden (2. Weg der Beweisführung). Über in-vitro-Kalluskultur lassen sich die Sterne in ihre einzelnen Komponenten zerlegen.

3.4. Abschließende Ploidiebestimmungen

3.4.1. Stern Nr.2, Blütentyp Nr.3 und Sternbildung an weiß/diploid, weiß/tetraploid sowie an der Laubblattvariante G HGG G

Zur Vervollständigung der Ploidienachweise insgesamt sollen die noch fehlenden Varianten, Stern Nr.2 und Blütentyp Nr.3 (siehe **3.1.**), analysiert werden:

- **Blütentyp Nr.3**

Diese Pflanze fiel durch ihre im Vergleich zu diploiden Formen stark vergrößerten Blüten auf, die zudem intensiver rot gefärbt waren (Farbwert Colour Card: 50 B im Gegensatz zu rot/diploid mit 44 D). Die Erhöhung von bestimmten Farbwerten nach Verdopplung der Chromosomenzahl ist bekannt (GRIESBACH und KAMO, 1996). Nach einer in-vitro-Kalluskultur konnte von diesem Typ ein Klonbestand aufgebaut werden, dessen homohistischer Charakter angenommen werden kann. Er diente auch zur mikroskopischen Analyse.



Abb.39: diploide Blüte (links) und Blüte von Typ Nr.3

In Kunststoffpräparaten konnten in allen Geweben (L1-, L2- und L3-bürtig) 26-28 Chromosomen gezählt werden (Abweichungen sind methodisch bedingt). Blütentyp Nr.3 wird deshalb als rot/tetraploid bezeichnet. Nach in-vitro-Kalluskultur blühten 50 Pflanzen rot, 1 rot mit weißem Sektor und 8 mit variegater Farbausbildung (siehe hierzu auch **3.5.**).

- Stern Nr.2



Abb.40: Blütentyp Nr.2: Stern/DP?

Der rote Bereich (Innenfeld) großvolumige, für den weißen Bereich (Rand) kleinvolumige Mesophyllzellen beobachtet werden. Eine Konstitution diploid - polyploid - ? (DP?) kann angenommen werden.

Ein Sproß zeigte über einen begrenzten Zeitraum Blüten mit unterschiedlich großen, weißen Sektoren:



Abb.41:

meriklinalchimärische Blüte mit den Konstitutionen diploid-polyploid (links oben) und polyploid-polyploid (restliche Hälfte)

Der linke Blütenteil entsprach qualitativen Zellgrößenvergleichen nach dem beschriebenen Typ Nr.2 (Stern/DP?), der rechte war homohistisch polyploid. Solcherart aufgebaute, nicht generell geschichtete Pflanzen werden Meriklinalchimären genannt (TILNEY-BASSETT, 1986).

- **Sternbildung an diploid/weiß und tetraploid/weiß**



Abb.42: Stern/TTT links und Stern/DDD

Kultiviert man einen Klonbestand über einen längeren Zeitraum, können neben Sprengelung einzelner Blüten auch Sprosse beobachtet werden, an denen sich wiederum ein Sternmuster manifestiert (siehe auch 3.5.1.). Klonbestände davon sind relativ stabil. Auch

an einem weiß blühenden Sämling aus Stern/DDD x Stern/DDD, der das A1-Gen noch (in inaktivem Zustand) besaß, bildete sich ein Sproß mit Sternmusterblüten.

Zwischen dem Ausgangstyp Stern/DDD und dem erneut gebildeten Stern an weiß/diploid bestehen keine Unterschiede. Die Sternbildung an weiß/tetraploid ergibt eine neue Sternvariante, weil sie homohistisch tetraploid ist. Das Flächenverhältnis zwischen rot und weiß in der Blüte entspricht dem von Stern/DDD, nur daß hier die Blüten insgesamt größer sind.

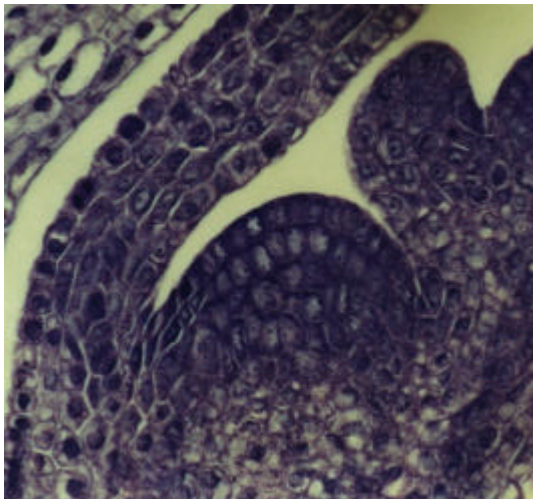


Abb.43: Sproßscheitellängsschnitt Stern/TTT, Kunststoffeinfärbung

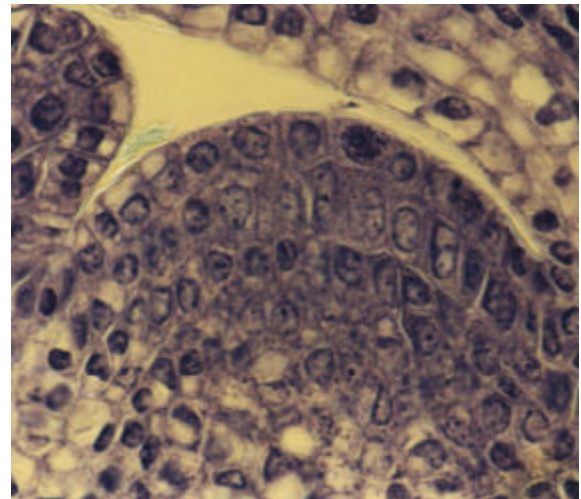


Abb.44: Sproßscheitellängsschnitt Stern/TTT mit Metaphase in L1 (27 Chromosomen gezählt: Soll 28, Abweichung methodisch bedingt), in L2 Zellkern mit 4 Nucleoli→Tetraploidie, Kunststoffeinfärbung

- **Sternbildung an der Laubblattvariante G HGG G**

Im Ergebnis der Kalluskultur entstanden zahlreiche Laubblattvarianten, die unter Punkt 3.8. behandelt sind. An einer von diesen, die einer ersten Musteranalyse nach als G HGG G (grün - hellgrün und wachstumsgehemmt - grün) angesehen werden kann, trat im weiß blühenden Klonbestand ein Sproß mit Sternmuster auf, der zwar vermehrt, aber letztendlich nicht als Klonbestand etabliert werden konnte. Hier hatte sich eine doppelte Markierung Chlorophyllgehalt und Blütenfarbe im Sinne von L1=grün-weiß, L2=hellgrün/wachstumsgehemmt-rot, (L3=grün-rot) ergeben.



Abb.45: Sternmusterblüte an
Laubblattvariante G HGG G

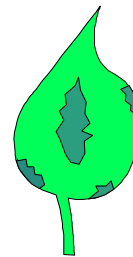
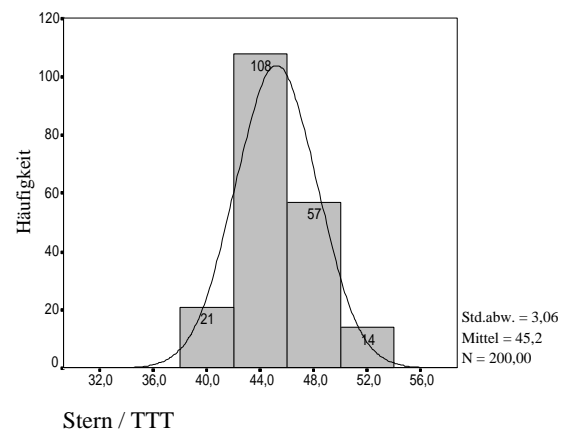
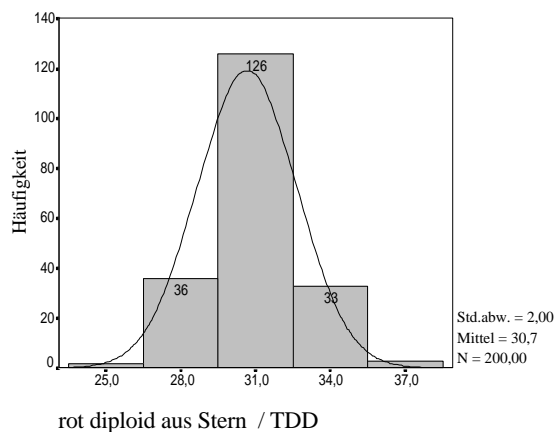
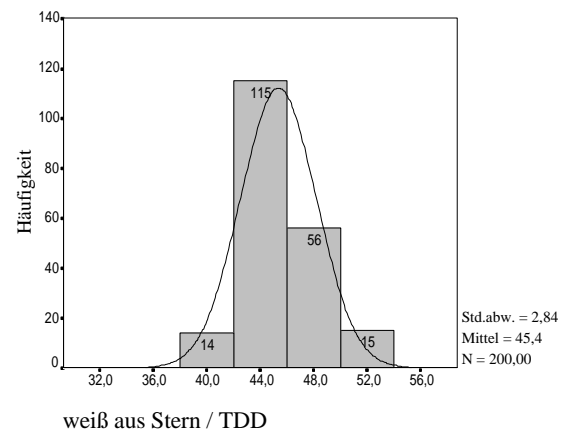
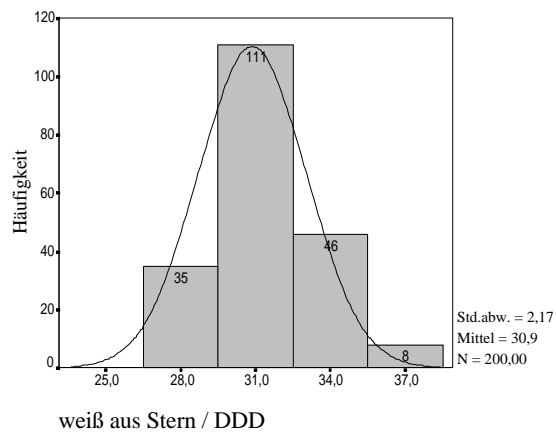
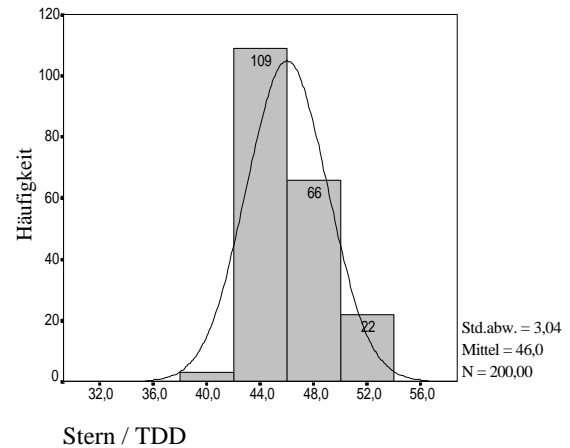
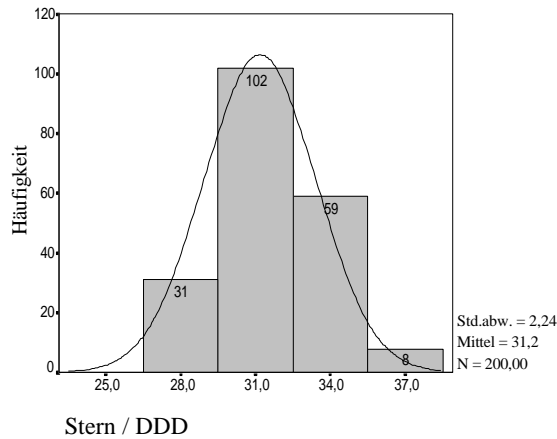


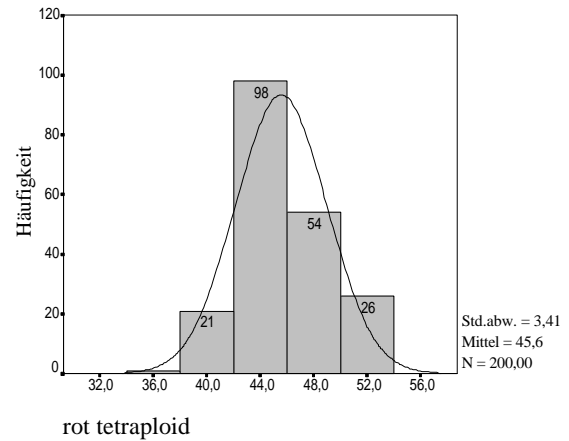
Abb.46: Laubblattmuster G HGG G

Trotz großer Klonbestände kam es bei allen anderen Laubblattvarianten zu keinen ähnlichen Erscheinungen.

3.4.2. Ploidievergleiche der einzelnen Varianten

Für die **Stomata-Längenmessung** (Angaben in μm) ergaben sich ausgehend von den bereits analysierten Typen Stern /DDD und Stern TDD folgende Häufigkeitsverteilungen für die einzelnen Varianten:





Die Stomatalängenmessungen wurden statistisch gegeneinander getestet, woraufhin sich ein schlüssiges Endresultat für die Ploidiestufe der L1 der einzelnen Varianten ergibt:

Mittelwertvergleiche (Stomatalänge) der einzelnen Varianten (T-Test)

	Stern/ DDD	Stern/ TDD	Stern/ DP(?)	Stern/ TTT	rot/dipl. (aus Stern/ TDD)	weiß/dipl. (aus Stern/ DDD)	weiß/tetrapl. (aus Stern/ TDD)	rot/tetrapl.
Stern/DDD		+	?	+	0	0	+	+
Stern/TDD	+		?	0	+	+	0	0
Stern/DP(?)	?	?		?	?	?	?	?
Stern/TTT	+	0	?		+	+	0	0
rot/dipl. (aus Stern/TDD)	0	+	?	+		0	+	+
weiß/dipl. (aus Stern/DDD)	0	+	?	+	0		+	+
weiß/tetrapl. (aus Stern/TDD)	+	0	?	0	+	+		0
rot/tetrapl.	+	0	?	0	+	+	0	

+ signifikant voneinander verschieden

0 kein signifikanter Unterschied

? keine ausreichenden Meßdaten

Methodenvergleich Ploidiebestimmung / Ergebnisübersicht

Variante	Zell-u. Zellkerngröße komparativ (Petalene- pidermis und -mesophyll)	Stomata- länge (Ø) in µm	Ø Flächen- inhalt /Petalen- epidermis- zelle (Binnenfeld, oben), A in µm ²	Anzahl Nucleoli	ermittelte Chromosomen- zahl / Kunststoffein- bettung (Abweichungen methodisch bedingt)
Stern/DDD	diploid	31,2	645	max. 2 in allen Schichten	14 in allen Schichten
weiß/diploid (aus Stern/DDD)	diploid	30,9	—	max. 2 in allen Schichten	13-14 in allen Schichten
Stern/TDD	Epidermis: polyploid, Mesophyll: Rand polyp., Binnenfeld diploid	46,0	1194	max. 4 in Epidermis, max. 2 subepidermal bzw. in L3- bürtigem Gewebe	27-28 in Epiderm. 13-14 in subepid., 12-14 in L3-bürtigem Gewebe
rot/diploid (aus Stern/TDD)	diploid	30,7	—	max. 2 in allen Schichten	13-14 in allen Schichten
weiß/tetraploid (aus Stern/TDD)	polyploid	45,4	—	max. 4 in allen Schichten	26-28 in allen Schichten
rot/tetraploid	polyploid	45,6	—	max. 4 in allen Schichten	26-28 in allen Schichten
Stern/TTT	polyploid	45,2	—	max. 4 in allen Schichten	26-28 in allen Schichten
Stern/DP(?)	Epidermis: diploid, Mesophyll: Rand diploid, Binnenfeld polyploid	31,5 (geringe Stichprobe)	—	—	—

3.5. Instabilitäten der Blütenfarbe

Wiederholt ist bereits davon die Rede gewesen, daß in weiß blühenden Klonbeständen ganz gleich auf welcher Ploidiestufe rote Sprenkelung der Blüten möglich ist. Die Sprenkelung ist fakultativ, tritt im Sommer verstärkt auf und hat unterschiedliche Intensitäten.



Abb.47: Sprenkelungsintensitäten
auf tetraploider Ebene

Vereinzelt treten in den Klonbeständen Blüten auf mit sektorialen Farbveränderungen:



Abb.48: weiß/tetraploid:

Blüte mit rotem Sektor



Abb.49: rot/diploid:

Blüte mit weißem Sektor

Auf der tetraploiden Ebene kam es bei rot/tetraploid zu einer bislang noch nicht beschriebenen Musterbildung. Sie war auf einige Sommerwochen beschränkt:



Abb.50: Blütenfarbveränderung an
rot/tetraploid

Das Muster unterscheidet sich im Phänotyp stark zu den als chimärisch bedingt nachgewiesenen Sternmustern (Stern/DDD, /TDD und /TTT). Einen Hinweis darauf, daß der Farbstoffausfall, der sich scheinbar als Sektor zeigt, nicht auf L1 beschränkt ist (wie bei den Sternmustern), liefern die isoliert von den roten Petalenbereichen liegenden roten Streifen. Phänotypisch ähnliche Muster beschreiben NAPOLI et al. (1990) und JORGENSEN (1995) nach Transfer eines Chalcon - Synthase-Gens, wobei die Ursache im Ausmaß

der variablen Musterbildung als Cosuppression erklärt wird. Eine gleiche Grundlage für die hier vorgestellte Variation zu vermuten, erscheint zumindest diskutabel, da mit dem tetraploiden Status die Kopienanzahl pro Genom erhöht ist, eine somatisch begrenzte

Inaktivierung des Farbgens durch Cosuppression also zum Farbausfall führen könnte. Die Auslösung von Cosuppression ist zudem als umweltabhängig (Streß) bekannt (ODENBACH et al., 1997). An dieser Stelle müßten biochemische Analysen einsetzen, um die Ursache dieser Farbvariation aufklären zu helfen.

Die Sprenkelung innerhalb ansonsten weiß blühender Klonbestände einschließlich Sektorbildung ist ein Zeichen dafür, daß das A1-Gen in diesen Formen noch präsent ist, allerdings in einem inaktiven Zustand. Nur partiell hebt sich diese Blockade auf, Pelargonidinderivate können auf diese Petalenbereiche begrenzt synthetisiert werden. Eignet sich diese Deblockade relativ spät im Prozeß der Blütenentwicklung, werden jeweils nur kleine Gewebebereiche von diesem Ereignis betroffen und es kommt zur Sprenkelung. Wird die Blockade des A1-Gens in einem frühen Stadium aufgehoben, entstehen Sektoren. Sektorialer *Farbausfall* konnte auch an rot blühenden Pflanzen entdeckt werden (Abb.49), ist hier aber eine seltene Erscheinung und die Umkehrung der (roten) Sektorbildung an weißen Blüten (Blockade des A1-Gens).

Die Sprenkelung an weiß/diploid und weiß/tetraploid kann sich wieder verlieren. Bei weiß/diploid führte sie in einigen Fällen zu roten Blütentypen, die sich (über den Winter) als solche stabil hielten.

Auf die Instabilitäten in der Blütenfarbe konzentrierten sich die Arbeiten am Max-Planck-Institut nach dem Gentransfer. Neben den „roten“ und „weißen“ Transformanten wurden auch die variegaten Typen auf molekularer Ebene in Hinblick auf die Anzahl der integrierten Genkopien und Methylierung in der Promotorregion untersucht (LINN et al., 1990/ MEYER, 1991). Es konnte nachgewiesen werden, daß mehrere Genkopien und Methylierung am Promotor zu weißen, eine Genkopie und keine Methylation zu roten Blüten führt. Ein Zusammenhang zwischen Kopie und Methylierung besteht insofern, als daß mehrere Genkopien im Genom bevorzugt methyliert und damit inaktiviert werden. Wichtig ist weiterhin die Region, in der das Fremdgen eingefügt ist (MEYER, 1995 A und B/ PRÖLS und MEYER, 1992). Fortan arbeitete man mit Transformanten, die nur eine intakte Genkopie in ihr Genom integriert hatten, weiter. Die Methylierungsvorgänge standen nun im Vordergrund (PRÖLS und MEYER, 1992).

In diesem Zusammenhang ist ein analoger Gentransfer interessant, der von ELOMAA et al. (1995) ebenfalls mit der weißen Petunienlinie RL01 vorgenommen wurde. Neben dem Mais-Gen A1 fand vergleichend ein ebenfalls die Dihydroflavonol 4-Reduktase codierendes Gen der *Gerbera* (gdfr) Verwendung. Für Instabilitäten in der Blütenfarbe, die nach Transfer des A1-Gens wie im Kölner Versuch auftraten, konnten auch in diesem Falle die Integration

mehrerer Kopien und Methylierungsvorgänge verantwortlich gemacht werden. Im Gegensatz dazu wurde die ziegelrote Blütenfarbe bei Transfer des *Gerbera*-Gens sehr stabil ausgebildet, Methylierungen traten höchst selten auf und die Anthocyangehalte waren insgesamt höher. (Von einem Sternmuster wird für diesen Transfer berichtet, allerdings ohne spezifischen Erklärungsansatz.) Beachtenswert beim gdf_r-Transfer ist eine positive Korrelation zwischen Farbintensität und Kopienanzahl pro Genom, also ein dem A1-Transfer völlig entgegengesetzter Sachverhalt. Der Diskussionsansatz für die Stabilitätsunterschiede zwischen transferiertem A1- Gen und gdf_r stützt sich dabei auf verschiedene Basengehalte (GC-Gehalt): Ist der Basengehalt zwischen Transgen und Integrationsort sehr verschieden, steigt die Wahrscheinlichkeit der Methylierung und damit die Störung der Fremdgenexpression. Das A1-Gen als "monokotyles Gen" ist GC-reich (60%), das gdf_r ("dikotyles Gen") GC-arm (39%). Offenbar ist das "dikotyle gdf_r" der *Gerbera* mit dem Petuniengenom besser kompatibel.

Im Kölner Versuch wurde letztendlich die Linie 17 (eine intakte Genkopie) für weiterführende Untersuchungen herangezogen, u.a. als Grundlage für den Freilandversuch. Dabei wiederum auftretende Methylierungen konnten als endogen bedingt, im Sinne einer Reaktion auf das „Erkennen von Fremd-DNA“, und gleichzeitig als umweltabhängig (Gewächshaus: 95% stabil, Freiland: 31% der Population stabil) charakterisiert werden (MEYER und HEIDMANN, 1994/ MEYER, 1995 A und B).

Damit wäre der genetische und biochemische Hintergrund der Instabilität umrissen. Diese Erscheinung auf gärtnerisch-pflanzenzüchterischer Ebene genauer zu beleuchten, war Ziel eigener Arbeiten:

3.5.1. Bonituren zur Sprenkelungsneigung

Im Klonbestand der „weißen“ Kallusregenerate auf diploider und tetraploider Stufe aus dem Entmischungsversuch der Sternmuster zeigte sich insbesondere in den Sommermonaten eine von Pflanze zu Pflanze unterschiedlich stark ausgeprägte Sprenkelung der Blüten. Es konnte beobachtet werden, daß offenbar verstärkt zur Sprenkelung neigende Typen existieren. Aus dem diploiden Klonbestand wurde ein Typ selektiert, der sich zu einem fast roten Blütentyp hin entwickelt hatte und über die Wintermonate in dieser Form stabil blieb. Nimmt man an, daß bei Kalluskultur eine Zelle zum Ausgangspunkt für eine neue Pflanze wird, wird die Variabilität in einem somatischen Sinne verständlich.

Sprenkelung selbst ist quantitativ schlecht erfaßbar. Es ist anzunehmen, daß die

Sternbildungen, wie sie bereits an weiß/diploid und weiß/tetraploid unter **3.4.1.** beschrieben wurden, in direktem Zusammenhang mit der Sprengelung stehen, was ihre Ursache betrifft. Es kann bei beiden davon ausgegangen werden, daß für die Variabilität das Ereignis (A) \longleftrightarrow A verantwortlich ist. Bei einer Sternbildung wird demzufolge die Blockierung des A1-Gens nur in L2 (und nicht nachweisbar evtl. in L3) aufgehoben. In L1 bleibt der Defekt erhalten, was zur Ausbildung der regelmäßigen weißen Sektoren führt.

Im Vergleich der diploiden und tetraploiden Klonbestände sind deshalb über den Zeitraum eines halben Jahres Neubildungen von Sternmustern [einzelne Sprosse, Sternmusterbildung = spezielle Form des Ereignisses (A) \rightarrow A] registriert worden mit folgendem Ergebnis:

weiß/diploid,	58 Pflanzen	1 Neubildung Stern (1,7% der Pflanzen).
weiß/tetraploid,	43 Pflanzen	4 Sprosse mit Sternmuster entstanden (8,15%)

Auf diese Weise entstand eine neue Variante des Sternmusters, das homohistisch auf tetraploider Stufe existiert und auf vegetativem Wege erhalten werden kann: Stern/TTT (siehe auch **3.4.1.**). Dabei wird die modifikative Seite dieser Chimärenbildung sichtbar.

Die weitaus häufigere Sternbildung auf tetraploider Stufe ließe sich damit erklären, daß auf tetraploider Ebene [(A) (A)] die Deblockierung eines A1-Gens rein quantitativ wesentlich häufiger zu Veränderungen des Phänotyps führt als bei diploiden Pflanzen [(A)]. Aus statistischer Sicht aber erfordert die Seltenheit dieser Sternbildung eine Erweiterung des Stichprobenumfangs. Die Tatsache, daß es zur Sprengelung neigende Typen gibt (Kreuzungsanalysen, Beobachtung einzelner Klone von Kallusregeneraten) wird hierbei eine klare Aussage erheblich erschweren.

3.6. Kreuzungsanalysen

Ein entscheidendes Kriterium zur Überprüfung des chimärischen Charakters einer Pflanze ist die Testung der Ererblichkeit. Sämlingsnachkommen dürfen dabei keine, ihren Eltern entsprechende Musterungen haben.

Die Sternmusterform hat in bezug auf das A1-Gen einen heterozygoten Zustand.

Da weißblühende Entmischungsprodukte (spontan und aus Kalluskultur) die Fähigkeit besitzen, rote Sprengelung zu zeigen bis hin zur Wiederausprägung des Sternmustertyps, wurde davon ausgegangen, daß eine Blockierung des A1-Gens vorliegt, die aufgehoben werden und wieder einsetzen kann [A \rightarrow (A) \rightarrow A].

Die L1 des Sternmusters ist farbdefekt (A1-Gen blockiert), die L2 ist intakt, was die von ihr ausgehende partnerinduktive Wirkung im Petalenbinnenfeld und das subepidermale Regenerat aus Kalluskultur Stern/TDD beweisen.

Gameten werden in der Regel von der zweiten Scheitelschicht (BRABEC, 1965/ BERGANN, 1967) gebildet. Setzt man nun die erste Mendelsche Regel voraus, kann folgende Hypothese aufgestellt werden:

F1 (aus Stern/DDD x Stern/DDD):	1 A A	rot : weiß
	2 A –	3 : 1
	1 – –	

F1 (aus weiß/dipl. x weiß/dipl.):	1 (A)(A)	rot : weiß
	2 (A) –	0 : 1
	1 – –	

F1 (aus Stern/DDD x weiß/dipl.)	1 A (A)	rot : weiß
	1 A –	1 : 1
	1 – –	
	1 (A) –	

Die tatsächlichen Ergebnisse geben abweichende bis gänzlich andere Aufspaltungsverhältnisse wieder (Bestäubungen und Aussaaten in verschiedenen Jahreszeiten) :

	<u>rot : weiß</u>	<u>Gesamtzahl der bonitierten Sämlinge</u>
F1 Stern/DDD x Stern/DDD:	1,6 : 1	531
F1 weiß/dipl. x weiß/dipl.:	1 : 4,4	461
F1 Stern/DDD x weiß/dipl.:	1 : 2,9	175

F1 weiß/dipl. x Stern/DDD:

1 : 1,5

86

Bei diesen, von der Mendelschen Regel abweichenden Aufspaltungsverhältnissen erscheint unwahrscheinlich, daß sich auch die farbdefekte L1 an der Gametenbildung beteiligt und damit den Anteil „Weißer“ erhöht, weil auch bei weiß/dipl. x weiß/dipl. rot blühende Nachkommen auftreten. Das bestätigen zusätzlich die Selbstung der Laubblattvariante GWG, die 61 weiße Sämlinge als Nachkommen hatte (L2=weiß), sowie die Selbstung von Stern/TDD, bei der keine triploiden Nachkommen entstehen (siehe unten). Wahrscheinlicher ist, daß auch auf dem generativen Wege die Instabilität des A1-Gens wirksam wird.

MEYER (1995 A) entwickelte zur Erklärung des Sachverhaltes ein Modell, daß Bezug auf den von BRINK (1973) beschriebenen Begriff der Paramutation nimmt. Dabei überträgt sich nach Kombination des unmethylierten Allels mit einem methylierten das Methylierungsmuster in den folgenden Zellteilungen, wodurch das unmethylierte Allel ebenfalls inaktiviert wird (siehe dazu auch 4.2.).

Auch andere der in dieser Arbeit beschriebenen Blütenvarianten wurden zu Kreuzungsanalysen herangezogen. Für Stern/TDD ergaben sich folgende Ergebnisse:

F1 aus Selbstung Stern/TDD

	rot : weiß	Gesamtzahl der bonitierten Sämlinge
1. Selbstung		
Herbst	2,7 : 1	132
2. Selbstung		
Winter	3 : 1	60
3. Selbstung		
Sommer	1,8 : 1	320

Die Selbstungen erfolgten in drei Abschnitten: Herbst, Winter und Sommer. Das ist insofern interessant, als daß die Aufspaltungsverhältnisse sich jahreszeitlich unterscheiden. Vorangegangen zu dieser bewußten Staffelung war die Beobachtung, daß die Sprenkelungsneigung (also die Instabilität des A1-Gens) im Sommer verstärkt auftritt.

Im Falle der 1. Selbstung wurde jede zweite, bei den beiden weiteren Selbstungen jede Pflanze auf ihren Ploidiegrad hin untersucht (Stomatamessung). Untersuchungen von STEERE (1932) bewiesen die Möglichkeit der Bildung triploider Petunien durch Kombination di- und tetraploider Gameten. Im hier dargestellten Versuch waren alle Pflanzen diploid und entsprechen damit ihrem Typus nach dem der zweiten Scheitelschicht der Mutterpflanze Stern/TDD. Dieses Ergebnis bezeugt, daß die L1 sich nicht an der Gametenbildung beteiligt (siehe oben).

Während bei Selbstung im Winter sogar die nach MENDEL erwartete 3:1 - Aufspaltung ermittelbar war, weichen die Werte bei Selbstung im Herbst leicht und im Sommer stark davon ab. Das Ereignis $A \longleftrightarrow (A)$ ist damit auch im generativen Versuch als umweltabhängig nachgewiesen. Als analoger Versuch wurde eine rote, aus Kalluskultur von Stern/TDD entstandene Variante (rot/diploid) geselbstet. Sie ist diploid und verkörpert die L2-Komponente von Stern/TDD. Für ihre Blütenfarbe ist ein heterozygoter Zustand anzunehmen: A .

F1 aus Selbstung rot/diploid

	rot : weiß	Gesamtzahl der bonitierten Sämlinge
Selbstung	1,9 : 1	206
(verschiedene Jahreszeiten)		

Durch gesonderte Bonitur gesprenkelter Blüten bei dieser Selbstung erwies sich ein deutlicher Unterschied zwischen Winter- und Sommerkultur. Während bei den im Winter blühenden Pflanzen der Anteil „Instabiler“ 4,5 % betrug, befand sich dieser Wert im Sommer auf einem Niveau von 21,5 %. Dieses Ergebnis und die bessere Annäherung der winterlichen Bonitur (Selbstung und Aussaat im Winterhalbjahr !) bei Selbstung Stern/TDD an die erwartete Mendel'sche Verteilung kann damit als licht- und temperaturbedingt erklärt werden (siehe dazu auch Ergebnisse Selbstung Stern/TDD:

Sommer: rot : weiß = 1,8 : 1, Winter: rot : weiß = 3 : 1).

Selbst als homozygot rot selektierte Pflanzen zeigen Instabilitäten in der Blütenfarbe und können weiß und gesprenkelt blühende Varianten in der Nachkommenschaft haben.

Gleichzeitig wird deutlich, daß es Neigungen bestimmter Typen zur Sprenkelung, den Bonituren im Klonbestand entsprechend, auch auf der generativen Ebene gibt. Um das zu dokumentieren, sollen zwei als homozygot Selektierte im Vergleich aufgeführt werden:

F1 Selbstung homozygot rot

(Selbstung und Aussaat erfolgte im Sommerhalbjahr.)

	rot : weiß	Gesamtzahl bonitierter Sämlinge	davon instabil (als rot bonitiert)
homo- zygot 17	35,6 : 1	403	26,3 %
homo- zygot 34	191 : 0	191	1,6 %

Dieses Ergebnis relativiert natürlich die vorangegangenen, die Umweltabhängigkeit belegenden Selbstungsergebnisse: Zumindest gibt es also auch eine auf das Individuum bezogene Neigung zur Sprenkelung. Eine diploide Variante, die durch ihre starke Sprenkelungsneigung aus einem Bestand weiß blühender Kallusregenerate (von Stern/DDD) selektiert wurde (unter Bonituren im Klonbestand erwähnt), hatte nach Selbstung in ihrer Nachkommenschaft sogar einen Anteil instabiler Farbausprägung von 31,8 % (von insgesamt 58 Pflanzen).

Zusammenfassend kann die Veränderlichkeit des Instabilitätsausmaßes, also des Ereignisses $(A) \longleftrightarrow A$, grundsätzlich als von Umweltverhältnissen abhängige Erscheinung betrachtet werden, wobei es Abweichungen durch verschieden ausgeprägte Sprenkelungsneigungen einzelner Typen geben kann. Offenbar existieren verschiedene Grade im Ausmaß der Methylation, die als Eigenschaft diesen speziellen Pflanzen (auch auf generativem Wege) erhalten bleiben (MEYER und HEIDMANN, 1994).

Das Sternmuster der transgenen Petunie jedoch ist selbst nicht vererbbar (im Gegensatz zu den von Petuniensorten bekannten Blütenmustern: siehe unter **1.4.1.**), auch wenn durch die Instabilität des A1-Gens die Neubildung eines Sterns theoretisch und praktisch möglich ist (siehe auch **3.4.1.** und **3.5.1.**). Damit kann auch der dritte Weg des Nachweises mit einer zugunsten der chimärischen Konstitution dieser Pflanze ausfallenden Beurteilung abgeschlossen werden.

Im Ergebnis der Selbstungen konnten auch diploide, weiß blühende Nachkommen selektiert werden, die homozygot weiß sind, keine Sprenkelung mehr zeigen und damit der Ausgangslinie vor dem Gentransfer entsprechen. Für weitergehende Experimente, eventuell auch eine züchterische Bearbeitung der transgenen Petunien auf tetraploider Stufe sollen an dieser Stelle die Fertilitätspotentiale der einzelnen Varianten vergleichend aufgelistet werden: Wie bei induzierter Polyploidie zu erwarten, ist die Fertilität bei den tetraploiden Varianten unterschiedlich stark beeinträchtigt (SCHEIBE, 1951/ SKIEBE, 1966/ BREWBAKER, 1967).

Zur Fertilität der einzelnen Varianten

	Samenansatz bei Kreuzung mit gleichploiden Varianten	Samenansatz bei Selbstung
Stern/DDD	gut	gut
rot/diploid (aus Stern/TDD), heterozygot (Blütenfarbe)	gut	gut
rot/diploid homozygot (Blütenfarbe)	gut	vermindert
weiß/diploid (aus Stern/DDD) heterozygot (Blütenfarbe)	gut	gut
weiß/diploid homozygot (Blütenfarbe)	gut	vermindert
rot/tetraploid	0	0
Stern/TDD	?	gut
Stern/DT(?)	?	0
Stern/TTT	0	0
weiß/tetraploid (aus Stern/TDD)	0	stark vermindert, gegen 0 (4 Sämlinge: weiß)
Blütenfarbmutanten nach in-vitro-Kalluskultur	0	0
Laubblattchimären nach in-vitro-Kalluskultur	?	gut
rot/diploid (aus Stern/TDD), (heterozygot) ♀ X 'Marathon blau' ♂ (sowie reziproke Kreuzung)	sehr gut	sehr gut

3.7. Zur Stabilität des A1-Gens bei Sorteneinkreuzung

Im züchterischen Zusammenhang ist die Stabilität des A1-Gens bei Einkreuzung in Sorten von entscheidender Bedeutung. Bereits LINN et al. (1990) und MEYER (1991) berichten von einer Kreuzung transgener Pflanzen mit einer cyanidinhaltigen handelsüblichen Sorte. Als cyanidin-roter Phänotyp (Blüten) und einer nur kleinen Menge an Pelargonidin wird die F1-Generation beschrieben. Die F2 spaltete in drei Farbklassen auf (Cyanidin-, Pelargonidin- und Mischtyp). Der Mischtyp besaß einen gegenüber der F1 erhöhten Pelargonidingehalt. Daß die transgene Form erfolgreich in die Züchtung eingegliedert werden kann, wurde geschlußfolgert. Die Antwort auf die Frage, warum die F1 nicht in unterschiedliche Farbtypen aufspaltete, wie man dem heterozygoten Zustand von RL01-17 nach vermuten könnte, bleiben die Autoren in beiden Veröffentlichungen schuldig.

Mit dem Ziel, den A1-Typ in den Multiflora-Typ zu integrieren, beschäftigten sich OUD et al. (1995). Sie nutzten die 1987 entstandene transgene Petunie sowohl als Vater wie auch als Mutter und konnten keine negativen Erscheinungen, einschließlich Instabilitäten, feststellen. Im Gegenteil gehen sie von einer Stabilisierung des A1-Gens bei Einkreuzung in Sorten aus.



Abb.51 : Kreuzungspartner rot/diploid x 'Marathon Dunkelblau' und Nachkommenschaft (unten)

Für eigene Untersuchungen wurde die Variante rot/diploid (L2-Komponente von Stern/TDD) genutzt. Sie repräsentiert den heterozygoten Typ RL01-17, wie er auch bei den beiden, oben erläuterten Versuchen Verwendung fand. Instabilitäten im Klonbestand (Gewächshaus) von rot/diploid sind sehr selten. Als Kreuzungspartner diente 'Marathon Dunkelblau', Firma Walz, die im Katalog als F1-Hybride ausgezeichnet ist.

Die F1-Generation erbrachte für

blau ♀ x rot ♂

175x dunkelrosa, 1 x hellrosa,

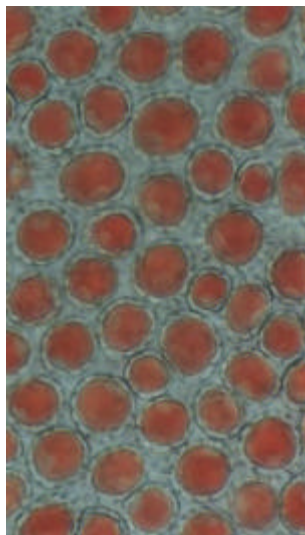
für die Reziprokkreuzung

rot ♀ x blau ♂

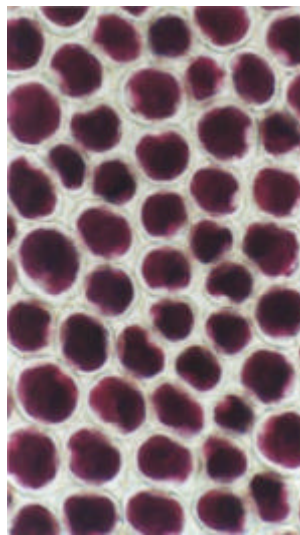
189x dunkelrosa blühende Pflanzen.

Die einheitliche Blütenfarbe verlangte eine Prüfung des F1-Status' von 'Marathon Dunkelblau'. 52 blau blühende Nachkommen erbrachte die Selbstung dieser Sorte; sie ist in Hinblick auf ihre Blütenfarbe als homozygot zu betrachten. Warum jedoch der heterozygote Charakter der transgenen Pflanze nicht zu Aufspaltung der Nachkommenschaft führte, muß diskutiert werden (siehe 4.2.).

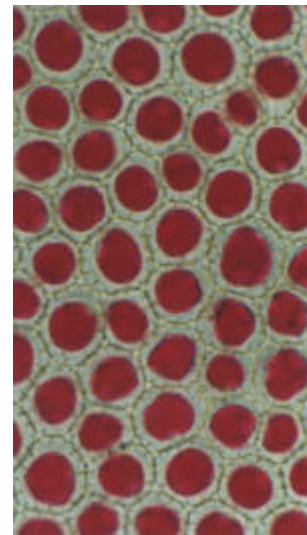
Klimaschrankversuche zeigten eine extreme Temperaturabhängigkeit des neu entstandenen Farbtyps 'Dunkelrosa': Bei nachts abgesenkten Temperaturen nimmt der blaue Farbanteil zu:



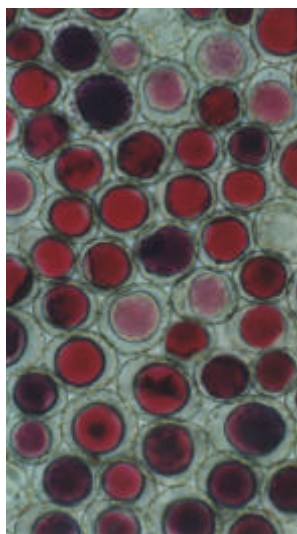
Rot/diploid



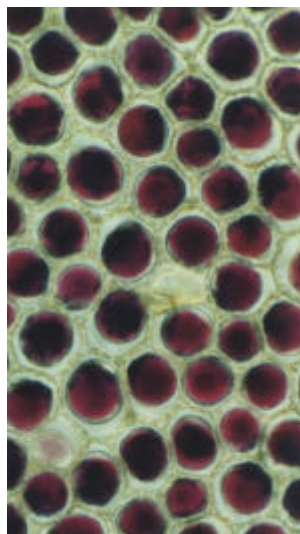
'Marathon Dunkelblau'



F1-Generation (dunkelrosa)



F1-Typ dunkelrosa bei <15°C



F1-Typ dunkelrosa bei <10°C

Abb.52:

Epidermenschema (obere Kronblattepidermis/ Aufsicht) der Kreuzungspartner und der Nachkommenschaft zur Veranschaulichung der Farbwerte (alle Präparate mit Plasmolyse)

An den dunkelrosa F1-Pflanzen traten unabhängig vom Temperaturregime Sektorbildungen unterschiedlicher Größe und Farbe auf:



Abb.53: blauer Sektor
an F1-Typ dunkelrosa



Abb.54: heller und blauer Sektor
an F1-Typ dunkelrosa



Abb.55: roter Sektor (nicht transgener Farbton!) bei unterschiedlichen Nachttemperaturen ($>15^{\circ}\text{C}$, $<15^{\circ}\text{C}$, $<10^{\circ}\text{C}$: Reihenfolge in Leserichtung)

Interessant sind Sektorenbilder bei dem einzigen hellrosa Farbtyp (aus blau ♀ \times rot ♂). Hier entstanden Petalensektoren, die unverfälscht den transgenen Farbton zeigen, sowie weiße Bereiche, in denen jegliche sichtbare Farbsynthese ausgefallen ist.



Abb.56: F1-Typ hellrosa



Abb.57: F1-Typ hellrosa mit Sektor (transgener Farbton!)



Abb.58: F1-Typ hellrosa mit zweifarbigem Sektor (transgener und weißer Farbton!)



Die aus Selbstung von 'Dunkelrosa' entstandene **F2** spaltet auf, wobei drei Farbklassen aufgestellt werden können:

- rosa/weiß
- violett
- blau.



Abb.59: einzelne Farbtypen der **F2**-Generation aus Selbstung (blau ♀ x rot ♂) und Selbstung (rot ♀ x blau ♂)

Auch hier in der **F2** erscheinen Instabilitäten (Sektorbildung und Sprenkelung):



Abb.60: sektoriale Farbveränderung



Abb.61: Sprenkelung der Blüte
(dieser Pflanze immanent)

Anders als bei den zitierten Versuchsdarstellungen zeigte sich bei diesem Kreuzungsexperiment, daß die Fähigkeit zu instabiler Blütenfarbausprägung bei Einkreuzung der transgenen Petunie in eine handelsübliche Sorte erhalten bleibt. Dabei kann der Farbausfall sogar auf die Farbkomponente der Sorte übertragen werden. Dieses Ergebnis gilt für die F1- und F2-Generation von blau x transgen/rot. Dem dunkelrosa Farbtyp, als Mischtyp zu verstehen, kann eine extreme Temperaturabhängigkeit der Blütenfarbe bescheinigt werden.

3.8. Somaklonale Variabilität nach in-vitro-Kalluskultur

Die Regeneration von Pflanzen aus einer Zelle bei Kalluskultur angenommen, macht anschaulich, daß einzelne Mutationsereignisse, die in der Regel auf einzelne oder wenige Zellen beschränkt bleiben würden, nun in ganzen Pflanzen manifest werden können. Hinzu kommt eine erhöhte Mutationsrate durch die chemisch (Hormone) induzierte, physiologische Kehrtwende, die ausdifferenzierte Gewebe machen müssen, um wieder meristematisch zu werden. Eine somit aus in-vitro-Kultur resultierende Formenbreite nennt man somaklonale Variation (LARKIN und SCOWCROFT, 1981 und 1982/ D'AMATO, 1986/ SKIRVIN et al., 1994). Aus den eigenen in-vitro-Kalluskulturen hervorgegangen sind eine Reihe von Blüten- und Laubblattvarianten, die eindrucksvoll die somaklonale Variabilität bei *Petunia* belegen:



Abb.62: einige Blütenvarianten nach in-vitro-Kalluskultur (diploide und tetraploide Ebene)

Auffällige Wuchsformen wie Gigas- und Zwergwuchs traten auf. Den größten Anteil an der Gesamtvariation allerdings hatten diploide Laubblattvarianten. In Kultur bildeten sich an ihnen zahlreiche neue Sproßvarianten:



Abb.63: Laubblattvariante nach Überführung der Kallusregenerate in Erdkultur



Abb.64:
Laubblattvarianten
nach in-vitro-
Kalluskultur und an
ihnen entstandene
Sproßvarianten

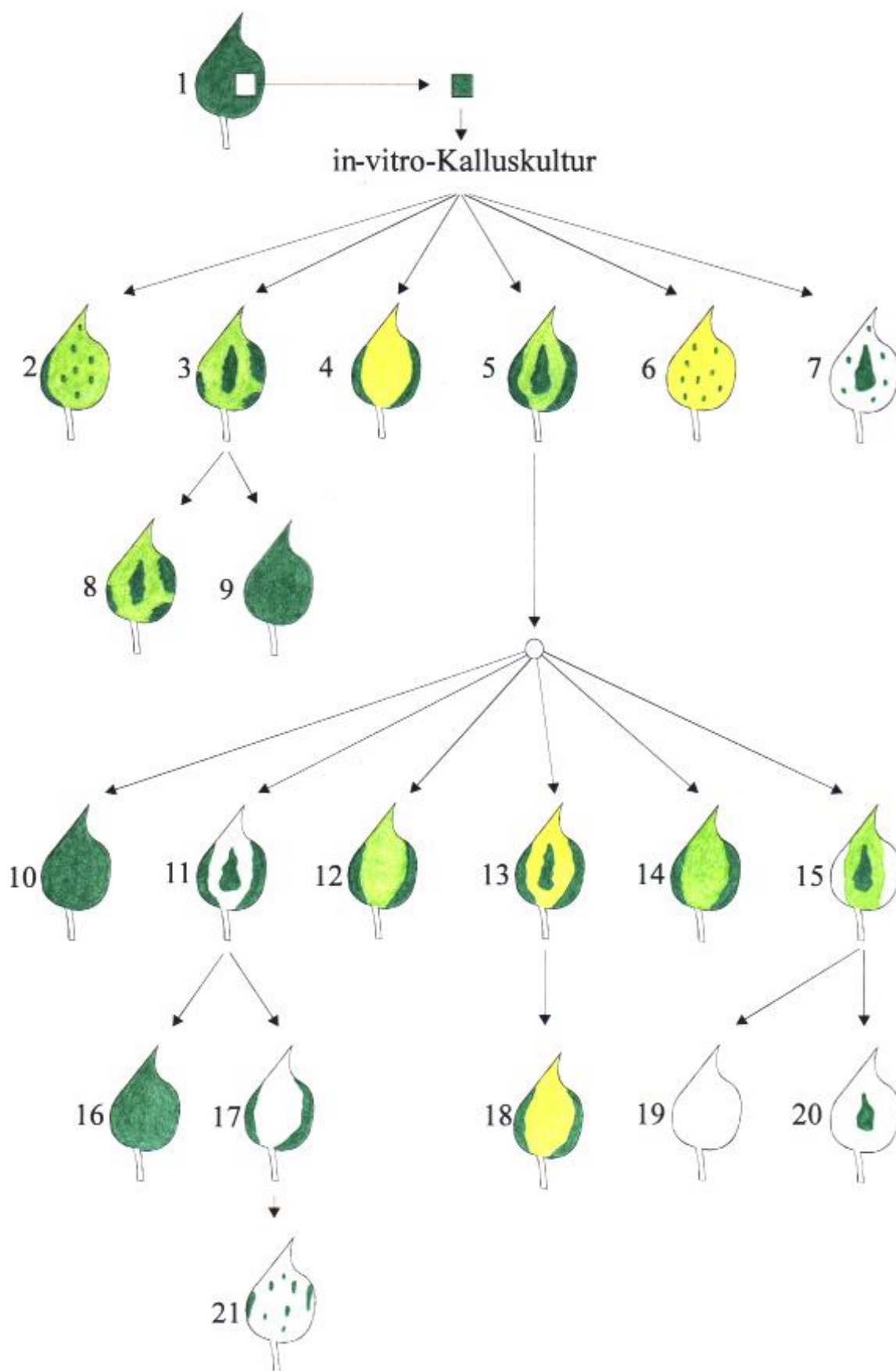


Abb.65:
Umlagerungs-
prozesse führen zu
Sproßvarianten

Unter den Kallusregeneraten befand sich ein gescheckter Typ (siehe Blattaufnahmen Abb.64). Dieser Phänotyp ist auch unter Sämlingen zu beobachten. Mit der nachweisbaren Erbllichkeit und Umweltabhängigkeit dieser Buntblättrigkeit bei *Petunia* befaßten sich CORRENS und KAPPERT (1936), wobei sie eine „labile Natur“ des verantwortlichen Gens vermuteten. Bei den sonstigen hier vorgestellten Mustern kann auf eine Abfolge genetisch voneinander verschiedener Sproßscheitelschichten und damit auf Chimärie geschlossen werden: Eine Musteranalyse nach dem Phänotyp läßt die Beteiligung dreier Schichten am Laubblatt erkennen. Hierbei ist die Beteiligung der L1 am Laubblatt-Randmesophyll (analog zu den Petalen) interessant, weil die Teilnahme der ersten Scheitelschicht an subepidermalen Geweben bei Dikotylen ansonsten als Ausnahme betrachtet wird (BERGANN, 1954/ 1955/ POHLHEIM und KAUFHOLD, 1985/ TILNEY-BASSETT, 1986).

Alle Laubblattvarianten blühten weiß, an G HGG G entstand ein Sproß mit Sternblütenmuster, was unter 3.4.1. behandelt wurde. Nach einer ersten Musteranalyse konnte den Scheitelschichten ein Chlorophylltyp zugeordnet werden. Die so analysierten Varianten sind auf einer Farbtafel in ihrem Stammbaum verzeichnet. Weitergehende Untersuchungen, auch zur Konkurrenz verschiedenploidier Gewebe, bieten sich an, weil hier bereits am Phänotyp Gewebeteilungen gut ablesbar sind. Für die GWG-Form kann bereits das Ergebnis einer Selbstung vorgestellt werden: Wie aufgrund der Gametenbildung von L2 zu erwarten ist, bestand die Nachkommenschaft ausschließlich aus (61) weißblättrigen Sämlingen, die wegen ihres vollständigen Chlorophylldefektes das Keimlingsstadium nicht überlebten.

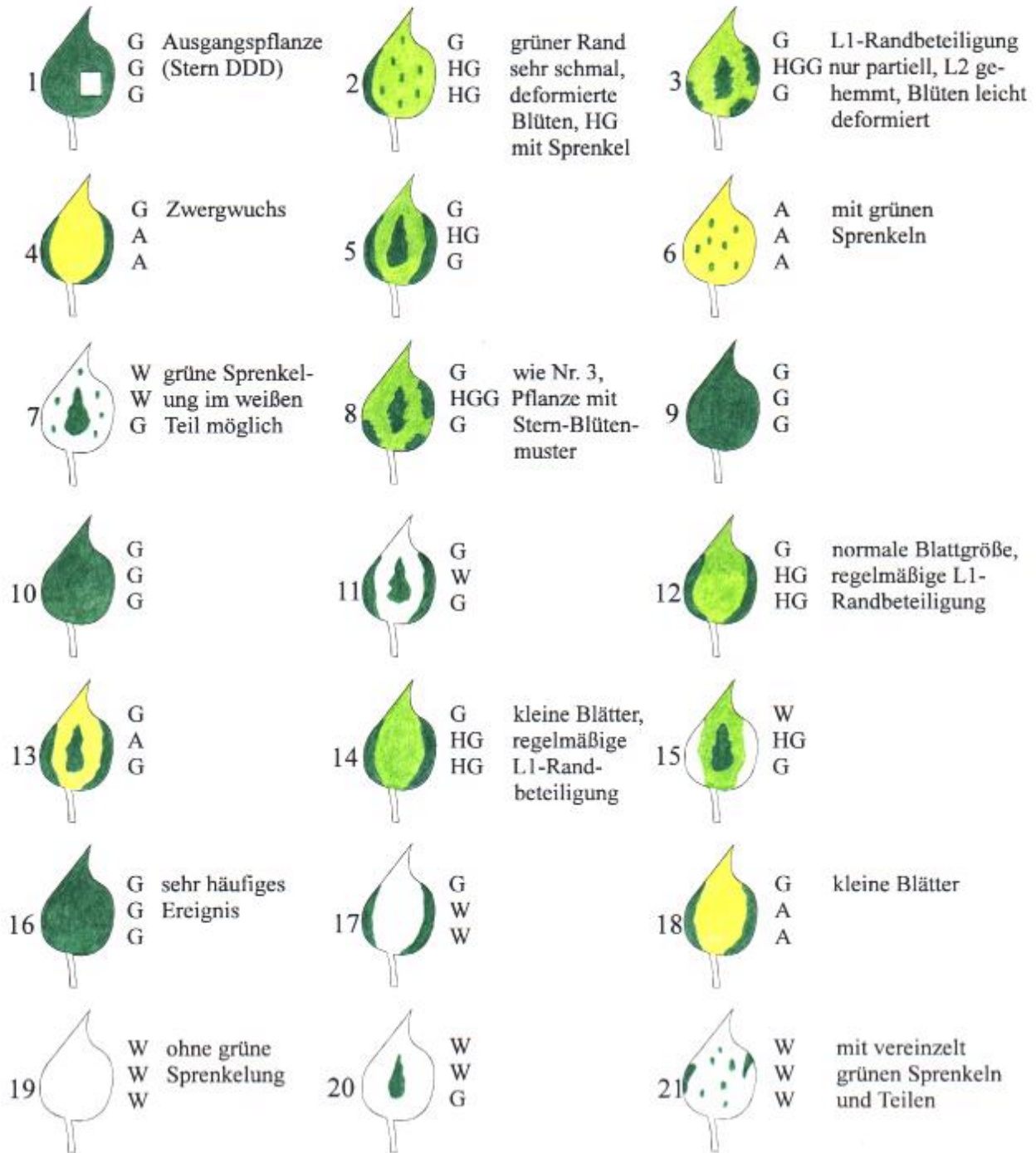
Stammbaum der Laubblattvarianten nach in-vitro-Kalluskultur



Legende

zum Stammbaum der Laubblattvarianten nach in-vitro-Kalluskultur

Infolge einer in-vitro-Kalluskultur (Laubblattexplantate von Stern DDD) entstanden variegated Formen, die, ausgenommen Nr. 8, weiß blühen:



W: weiß
A: gelb
HG: hellgrün
HGG: hellgrün, wachstumsgehemmt
G: grün

Die Nummern 2 bis 7 entstanden direkt aus der in-vitro-Kalluskultur; aus diesen wiederum bildeten sich spontan in der Gewächshauskultur die Nummern 8 bis 21 zunächst als Sproßvarianten. Entnommene Stecklinge dienten zum Aufbau entsprechender Klone.

3.9. Überlegungen zur Definition eines reformierten Systems von Blütenfarbvariation

Verschiedenfarbigkeiten bzw. Farbmuster bei Blüten sind im Pflanzenreich keine Ausnahmen, sie sind zu einem großen Teil art- bzw. sortentypisch und damit vererbbar (*Dianthus* L., *Viola-Wittrockiana*-Hybriden, *Convolvulus arvensis* L. etc.). Oft auch sind diese Muster modifikativ veränderbar, insbesondere von Licht- und Temperaturverhältnissen abhängig (Sternmustersorten bei *Petunia*,

Sternmuster bei *Campanula scheuchzeri* L. nach Dunkelheit: eigene Ergebnisse, Musterveränderungen bei unterschiedlicher Temperatur: *Viola* - *Wittrockiana*-Hybriden: HARDER, 1938).



Abb.66:
Sternmuster-
sorten der
Petunie:
Variabilität in
der Farbver-
teilung auf-
grund von
veränderten
Temperatur-
und Lichtver-
hältnissen



Abb.67: *Convolvulus arvensis*

Auch können diese artspezifischen Muster aufgrund anatomisch-morphologischer Besonderheiten zustandekommen (*Lonicera spec.*: in Knospe überlappende Petalenbereiche erscheinen später heller gefärbt: POHLHEIM, unveröffentlicht, *Solanum gentianoides* L.: Struktur der verwachsenen Petalen führt zu unterschiedlichen Farbwerten).



Abb.68: *Solanum gentianoides*



Abb.69: *Pelargonium - Peltatum* – Hybride
'Mexikanerin'

Als pflanzensaftübertragbar hingegen hat man Petalenmusterung bei der *Pelargonium-Peltatum*-Hybride 'Mexikanerin' erkannt. Nach in-vitro-Kultur und Wärmebehandlung entstand eine rot blühende Sorte 'Mexican Beauty' (CASSELLS und MINAS, 1983). Ein der 'Mexikanerin' ähnliches Muster zeigte die Pelargonien-sorten 'Rote Luisenhof' bei Übertragung des Pflanzensaftes von 'Mexikanerin' (POHLHEIM, unveröffentlicht). Blütenfarbveränderungen, die eine Virusinfektion zur Ursache haben, sollten ebenfalls bedacht werden (LESEMANN et al. 1996).



Abb.70: *Pelargonium* - *Peltatum* - Hybride
'Mexican Beauty'

Komplizierter werden die Sachverhalte, wenn genetische bzw. epigenetische Veränderungen zu Musterungen führen.

Dabei soll nun versucht werden, anhand von Fallbeispielen ein System zu schaffen, daß der offensichtlichen Dynamik bei diesen Blütenfarbveränderungen gerecht wird. Zunächst werden hier, die Besonderheit der in dieser Arbeit analysierten Sternmusterform der transgenen Petunie im Hintergrund, einzelne, zum Teil noch fragmentarisch analysierte Blütenfarbvariationen vorgestellt, u. a. mit dem Ziel, die Verschiedenartigkeiten zu demonstrieren:



Abb.71: *Saintpaulia ionantha* 'Mandy',
als weiß-blau-blau (L1-L2-L3)-Chimäre
nachgewiesen (PLASCHIL, 1997)



Abb.72: *Syringa vulgaris* L. 'Sensation',
Sport von 'Hugo de Vries'
regelmäßiger weißer Rand,
Untersuchungen notwendig



Abb.73: *Phlox maculata* L.
'Natascha',
regelmäßiger weißer Rand (Existenz
ähnlicher Sorten in den 30er Jahren
dieses Jahrhunderts: Auskunft
Staudengärtnerei), Untersuchungen
notwendig



Abb.74: *Phlox subulata* L.
'Striped Candy',
chimärische Konstitution wahr-
scheinlich (PLASCHIL, 1997)



Abb.75: *Pelargonium-Zonale-Hybride* 'Mr. Wren', chimärischer Charakter (weiß-rot-rot) wahrscheinlich, insbesondere im Herbst (Temp.↓) treten im weißen Petalenrand isoliert vom roten Binnenfeld rote Sprenkel auf, Wurzelaustrieb rotblühend, F1-Aufspaltung in rot und rosa (CASSELLS und MINAS, 1983/ PLASCHIL, 1997), Untersuchungen notwendig



Abb.76: *Rhododendron simsii* Planch.
'Mevrouw Gerard Kint', stabile weiße Randbildung am Kronblatt , Periklinal-chimärie wahrscheinlich (PLASCHIL, 1997)



Abb.77: *Rhododendron japonicum* Suring. 'Kermesina Rose', Weißrand am Kronblatt relativ stabil, rote Sektoren und rote Blüten möglich (Entmischung ?), chimärische Konstitution wahrscheinlich, Untersuchungen notwendig



Abb.78: *Rhododendron simsii*
 ‘Weißrand, gesprenkelt’,
 chimärischer Charakter wahrscheinlich, Untersuchungen notwendig,
 weißer Rand, rosa Binnenfeld, rote
 Sprenkelung über die gesamte Petale,
 Auftreten gänzlich roter Blüten
 (spontan), weißgerandeter Sektor
 ohne Anthocyan (spontan)



Abb.79: *Rhododendron simsii*
 ‘Weißrand, gesprenkelt’,
 weißgerandeter Sektor
 (ohne Sprenkel)

Mikroskopischer Befund von *Rhododendron simsii* ‘Weißrand, gesprenkelt’:

normale Farbstoffverteilung bei *Rhododendron simsii*: Vakuolenfarbstoffe in oberer und unterer Epidermis und im Mesophyll

A weißer Rand mit roten Sprenkeln

Vakuolen in Epidermis und Mesophyll sichtbar, fast weiß, rote Sprenkel in beiden Epidermen erscheinen als Inseln mit seitlicher partnerinduktiver Wirkung, zum Teil auch Mesophyll mitgefärbt

B rosa Binnenfeld

Farbstoff im Mesophyll wie bei roter Blüte, schwache Anthocyanfärbung in den Epidermen (evtl. partnerinduktive Wirkung (unvollständige Kompensation) von L2-bürtigem Mesophyll auf defekte, L1-bürtige Epidermen, dunkelrote Vakuolen im Falle der Sprenkel, partnerinduktive Seitenwirkung sichtbar

C weißgerandeter Sektor (ohne Sprenkel)

weiß, keine gefärbten Vakuolen

D rote Blüte

Vakuolenfarbstoffe (rot) in oberer und unterer Epidermis und im Mesophyll



Abb.80: *Viola sororia* Willd. ‘Weiß mit blauen Adern’, als Sorte im Handel, relativ gleichmäßige Sprenkelung, Untersuchungen notwendig



Abb.81: *Spiraea x bumalda* Burvenich ‘Shirobana’, spontane, sektorale Rotfärbung ansonsten weißer Blüten bzw. ganzer Teile des Blütenstandes, sektorale Anthocyanfärbung ist bereits im Sproß und an den Laubblättern sichtbar, Untersuchungen notwendig



Abb.82: *Pelargonium* - Zonale - Hybride 'Eggshell',
weiße Blüten mit unterschiedlich großen roten
Anteilen, Auftreten gänzlich roter Blüten,
Aufspaltung der Nachkommenschaft in rot /
weiß / weiß mit roten Anteilen (PLASCHIL,
mündliche Auskunft),
Untersuchungen notwendig



Abb.83: *Rosa hybrida* L. 'Astrid
Späth', rosa Blüte mit roten Anteilen,
Auftreten gänzlich roter Blüten,
Untersuchungen notwendig



Abb.84: *Impatiens*-Hybride:
Blütensprenkelung vererbbar



Abb.85: *Rosa foetida* L. 'Bicolor',
 Petalenoberseite rot, Unterseite gelb,
 spontan gelbe Sektoren (relativ häufig),
 oranger Mischtyp (selten), roter Sektor
 Petalenunterseite (selten), Untersuchungen
 notwendig

rechts: Querschnitt Petale mit gelbem
 Sektor (Petalenoberseite) und rotem Sektor
 (Petalenunterseite)

Mikroskopischer Befund von *Rosa foetida* 'Bicolor'

Farbverteilung: Vakuolenfarbstoffe (rot) in
 oberer Epidermis, alle Gewebe mit gelben
 Chromoplasten, zwischen gelbem Sektor
 (Farbstoffausfall rot in oberer Epidermis)
 und roter oberer Epidermis seitliche
 Partnerinduktion sichtbar, bei rotem Sektor
 Petalenunterseite mit Vakuolenfarbstoff (rot)



- **Zu den chimärischen Petalenmustern**

Die relativ hohe Stabilität chimärisch bedingter Petalenmuster läßt diese, auf eine/einzelne Sproßscheitelschicht/en beschränkte Form der Farbmutation als klar abgrenzbares und sauber nachzuweisendes Phänomen (Entmischung spontan/in vitro, Überprüfung der Erbllichkeit, doppelte Markierung einzelner Scheitelschichten) erscheinen. (Hier sollen nur periklinal-chimärische Muster betrachtet werden, nicht die weniger stabilen und oftmals in periklinal-chimärischen Konstitutionen resultierenden Sektorial- und Meriklinalchimären.) Für Chimera-Sorten von *Saintpaulia ionantha* (PLASCHIL, 1997), *Pelargonium - Zonale* - Hybride 'Rosa Liebling' (POHLHEIM und RÖSSEL, 1989), *Verbena*-Hybride 'Aphrodite' (PLASCHIL, 1997) etc. sind die Muster als chimärisch bedingt nachgewiesen (siehe auch 1.3.)

Die Defektmutation eines Farbgens führt zu chimärentypischer Musterung in Abhängigkeit davon:

1. in welcher Sproßscheitelschicht sie erfolgte,
2. wie diese Schicht sich am Aufbau des Kronblattgewebes beteiligt,
3. welche Petalengewebe normalerweise Farbstoff bilden,
4. ob partnerinduktive Wirkungen auftreten.

Dazu einige Beispiele (in Anlehnung an PLASCHIL, 1997):

- (I) Der Farbdefekt beschränkt sich auf L1, diese Scheitelschicht bildet das Randmesophyll des Kronblattes, die Farbstoffsynthese findet normalerweise in den Epidermen statt, Partnerinduktion ist von L2-bürtigem auf L1-bürtiges Gewebe möglich: Ein Sternmuster entsteht.
(*Verbena* 'Aphrodite', *Pelargonium - Zonale* - Hybride 'Rosa Liebling')
- (II) Die Typik von (I) trifft in allen Punkten zu, nur daß keine partnerinduktiven Wirkungen möglich sind: Die Pflanze besitzt einheitlich gefärbte Kronblätter, dem Defekt entsprechend.
(*Pelargonium - Zonale* - Hybride 'Weißer Liebling')
- (III) Die farbdefekte L1 bildet Epidermis und Randmesophyll des Kronblattes, Partnerinduktion ist möglich, Epidermis und Mesophyll sind normalerweise Farbstoffträger: Ein Sternmuster entsteht.
(*Rhododendron simsii* 'Mevrouw Gerard Kint', *Saintpaulia*-Blütenblattchimären:)

- (IV) Die farbdefekte L1 beteiligt sich nicht am Randmesophyll, Partnerinduktion ist möglich, Farbstoffsynthese findet normalerweise in Epidermis und Mesophyll statt: Einfarbige Blüten entstehen mit neuem Farbwert
(im Falle der Brakteen von *Euphorbia pulcherrima* ‘Eckes Rosa’ rosa: BERGANN, 1961 und 1962).
- (V) Der Farbdefekt beschränkt sich auf eine nicht farbstoffführende Schicht: keine Farbveränderung trotz chimärischer Konstitution

- **weitere Blütenfarbvarianten**

Nun existieren weiterhin Blütenfarbvarianten, die weder virusbedingt bzw. pflanzensaftübertragbar, genetisch fest determiniert, noch chimärische Muster aufgrund einer Defektmutation sind. Deutlich wird das an der *Pelargonium-Zonale*-Hybride ‘Eggshell’, die auf weißer Blütengrundfarbe rote Sprenkel unterschiedlicher Größe zeigt; auch rote Sektoren bis gänzlich rote Blütenstände treten auf. Andere Pflanzen zeigen ebenfalls spontan auftretende Sektoren (*Spiraea bumalda* ‘Shirobana’, *Rosa hybrida* ‘Astrid Späth’, *Rosa foetida*).

Auch gesprenkelte Blüten sind keine Ausnahmen (*Viola sororia* ‘Weiß mit blauen Adern’).

Vielfältige Ursachen können zu gleichen Erscheinungsbildern führen (MARCOTRIGIANO, 1997, PLASCHIL, 1997).

Solange für all diese Pflanzen keine speziellen Nachweise geführt sind, können sie nicht weiter zugeordnet werden.

Die relativ unregelmäßig auftretenden Farbveränderungen können einen Hinweis geben auf eine Instabilität des Farbgens, das heißt, die Genexpression ist variabel. Das kann unterschiedliche Ursachen haben. Ob es sich dabei um Methylierungsvorgänge (MEYER et al., 1992), transponible Elemente (CORNU und FARCY, 1994), instabile Allelzustände (BIANCHI et al., 1978/ FARCY und CORNU, 1979, EPPERSON und CLEGG, 1992) oder andere Inaktivierungsprozesse handelt, sei zunächst dahingestellt und nicht unbedingt bedeutsam für die weiteren Gedankengänge.

An dieser Stelle soll zunächst an die Muster der *Pelargonium - Zonale* - Hybride ‘Mr.Wren’ und *Rhododendron simsii* ‘Weißbrand, gesprenkelt’ erinnert werden: ‘Mr.Wren’ hat eine nach weiß veränderte L1, die sich am Randmesophyll des Kronblattes beteiligt, und eine durch Partnerinduktion von L2-bürtigen Mesophyll in den Epidermen hervorgerufene Anthocyansynthese im Binnenfeld. Dadurch entstehen rot gefärbte Petalen mit einem weißen Rand (Typ I: S.70). In diesem weißen Rand jedoch treten zuweilen rote Sprenkel auf, die im

Herbst bei niedrigerer Temperatur an Anzahl stark zunehmen und keinen Kontakt zu L2-bürtigem (intakt = rot) Gewebe haben, damit also einer Fähigkeit der L1 zuzuschreiben sind. Von einer Defektmutation wie bei den oben beschriebenen „klassischen“ Periklinalchimären kann man hierbei nicht sprechen. Das Farbgens kann wieder aktiviert werden, es ist instabil. Das ist nicht unbedingt ein Widerspruch zur Existenz der relativ stabilen chimärischen Konstitution dieser Pflanze. Die (reversible) Blockade des Farbgens blieb bei der Entstehung dieser Sorte auf die L1 beschränkt. Es ergab sich eine stabile Konstitution, die sortenecht auf vegetativem Wege vermehrt werden kann.

In diesem Zusammenhang ist auch *Rhododendron simsii* 'Weißbrand, gesprenkelt' zu betrachten, nur daß hier die Instabilität des roten Farbgens auf somatisch beschränkte Bereiche (Sprengel) über die gesamte Epidermis sichtbar werden (was unter anderem auch der schwach rosa Farbe im Binnenfeld der Petalen zu verdanken ist, die wahrscheinlich aufgrund von Mesophyllfarbe und deutlich unvollständiger partnerinduktiver Kompensation des Farbdefekts in der Epidermis zustande kommt).

Daß die Instabilität des roten Farbgens unterschiedliche Grade hat, beweist die Existenz eines weißbrandigen Sektors einer Blüte (siehe Abb.79).

Die roten Sektoren und einheitlich roten Blüten könnten als L1-Perforation (Verdrängung L1-bürtigen Gewebes durch L2-bürtiges), aber auch als Deblockade des Farbgens über die gesamte Blüte interpretiert werden. Da bei *Rhododendron simsii* stabile Muster ohne Sprengelung bekannt sind, für die eine chimärische Konstitution durch eine Anthocyandefektmutation angenommen werden kann, erscheint der hier vorgestellte Typ wie ein Bindeglied zwischen einheitlich gefärbten Petalen und stabiler, auf einer Defektmutation beruhender, periklinalchimärischer Musterung.

Vielleicht hilft es zum Verständnis, die Instabilität als einen unvollständigen Defekt des Farbgens zu betrachten.

Gleiches trifft wahrscheinlich für die *Pelargonium - Zonale* - Hybride 'Mr. Wren' zu.

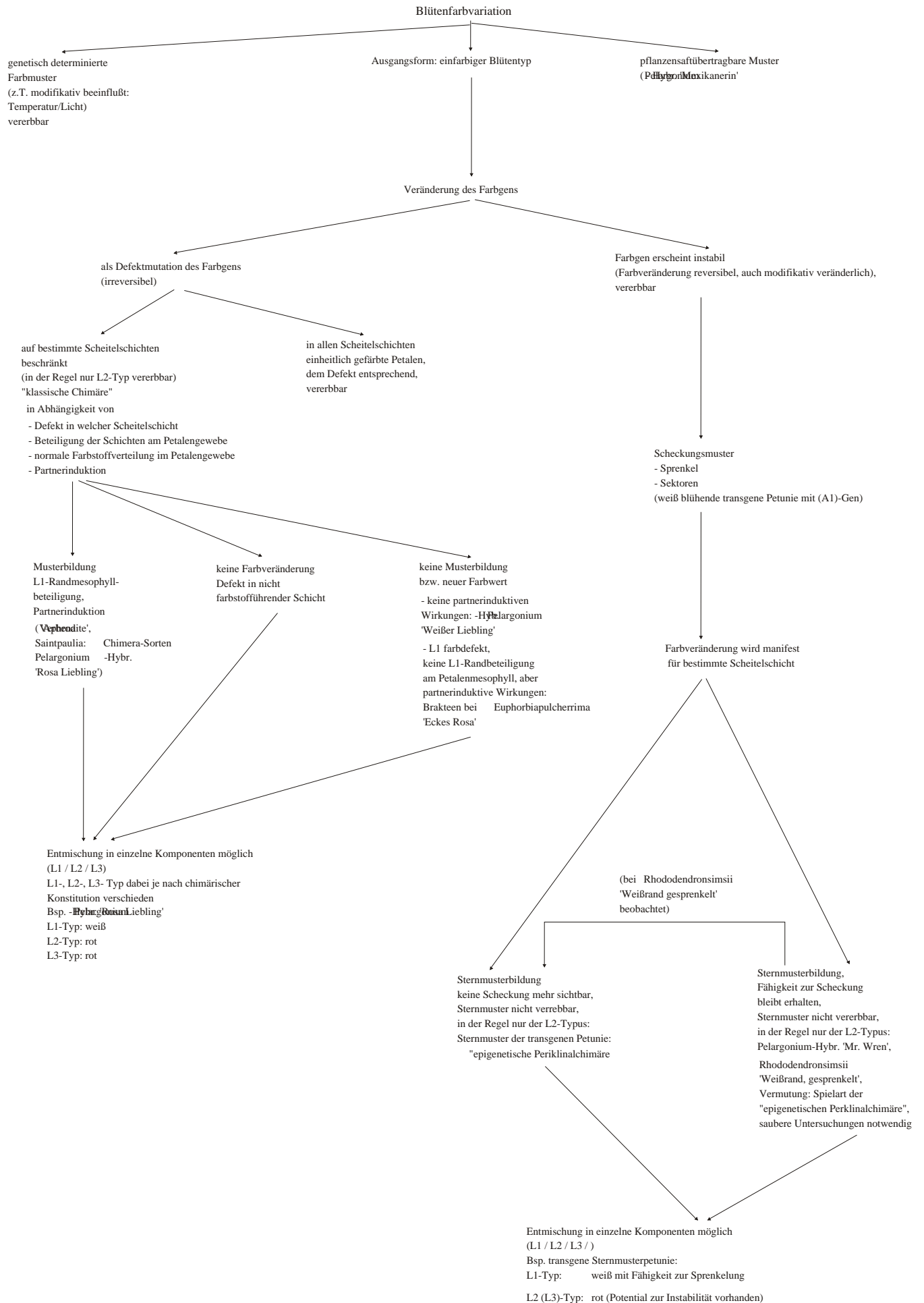
Auch bei der transgenen Sternmusterpetunie ist die Instabilität des Farbgens (hier wissen wir die Ursache: Methylierungsvorgänge) die Grundlage zur Bildung des Blütenmusters. Diese Pflanze wird deshalb im Rahmen dieser Arbeit als „**epigenetische Periklinalchimäre**“ bezeichnet (siehe 4.2.).

Die *Pelargonium - Zonale* - Hybride 'Mr. Wren' und *Rhododendron simsii* 'Weißbrand, gesprenkelt' als der transgenen Sternmusterpetunie vergleichbar anzusehen, erscheint nachvollziehbar.

Die (histologisch-anatomische) Stabilität dieser Konstitutionen ist damit nicht verschieden zu den von „klassischen“ Periklinalchimären bekannten.

Mit diesen Erörterungen wird auch die Dynamik deutlich, in die Farbmusterung von Blüten eingebunden ist. Auch chimärisch bedingte Farbmuster existieren in verschiedenen Abstufungen, wobei die Erfüllung bestimmter Bedingungen (Defektmutation bzw. Instabilität in welcher/n Sproßscheitelschicht/en manifest, gegebenenfalls Frequenz der Instabilität, histologische Entwicklungsmuster, originale Farbstoffverteilung) entsprechende Phänotypen herbeiführt. In einem vorläufigen Bestimmungsschlüssel ist nachfolgend versucht, diese Erläuterungen in einem Zusammenhang darzustellen.

Vorläufiger Bestimmungsschlüssel Blütenfarbvariation



4. Diskussion

Die histogenetische Ursache des Sternmusters der transgenen Petunie konnte lückenlos belegt werden. Diskussionspunkte liefern die Instabilität des A1-Gens als Ursache der Sternmusterbildung, die Stabilität des A1-Gens im Klonbestand, in Selbstungen und Sorteneinkreuzungen, methodisch vergleichende Arbeiten zur Ploidiebestimmung, Untersuchungen zu den partnerinduktiven Wirkungen, die Gewebekonkurrenz verschiedenploidier Gewebe, sowie die Sachverhalte der somaklonalen Variation.

4.1. Ploidienachweise

Um die Ploidiestufe einer Pflanze bzw. von Geweben zu bestimmen, ist die Chromosomenzählung der direkteste Weg. So gängig diese Methode ist (PRYOR, 1972/ POHLHEIM, 1978/ HOPKINS et al., 1996), unterliegt sie aber zum Teil erheblichen Einschränkungen: Nicht bei allen Pflanzen glückt die Präparation nach herkömmlichen Quetschmethoden von Wurzelspitzen (DARLINGTON und LA COUR, 1963/ ROMEIS, 1989). Und werden Wurzelspitzen genutzt, gewinnt man in der Regel lediglich eine Aussage zum Ploidiegrad der dritten Scheitelschicht aufgrund der endogenen Anlage von Stecklingswurzeln. Gerade bei chimärisch konstituierten Pflanzen reicht diese Aussage nicht aus (KAMO und GRIESBACH, 1993). Schichtenbezogene Chromosomenzählungen sind hingegen in Dauerpräparaten möglich, wie hier in der Arbeit anhand von Kunststoffeinbettungen erfolgt. Zellteilungsstadien werden fixiert und im Falle der Metaphase zählbar.

Mit einer der Chromosomenzählung entsprechenden Sicherheit ist die Ermittlung der Anzahl der Kernkörperchen (Nucleoli) anwendbar. ADANIYA und ARDIAN (1994) schlagen dazu eine Färbevariante mit AgNO_3 vor. Im eigenen Versuch konnten die Werte über die Kunststoffeinbettung und Färbung mit Toluidin ermittelt werden, wobei die maximale Anzahl der Nucleoli Aufschluß über den Ploidiegrad gibt (2 Nucleoli \rightarrow diploid ; 4 Nucleoli \rightarrow tetraploid). Voraussetzung für diese beiden Methoden ist eine histologische Analyse, da nicht unbedingt als bekannt vorausgesetzt werden kann, welche Scheitelschicht sich wie stark am Aufbau welcher Gewebe beteiligt. So ist das Mesophyll bei *Petunia* sowohl in Laub- wie in Blütenblättern nicht immer von L2 bzw. L3 abstammend. Im Kronblatt beteiligt sich die L1 regelmäßig am Randmesophyll (weiße Sektoren der Sternformen) und auch am Laubblatt wird Mesophyll am Rand von L1 gebildet. In die Kelchblätter wiederum fließen nur L1- und L2-bürtige Gewebe ein, wie Laubblattvarianten (siehe Farbtafel I) zeigen.

Wegen der aufgeführten Schwierigkeiten bei der Chromosomenzählung haben sich eine Reihe

von indirekten Untersuchungsmethoden als brauchbar erwiesen, die alle auf der Grundlage basieren, daß höherploidie Gewebe im Bereich bis zu ihrem Ploidieoptimum größere Zellen besitzen. Kennt man die Herkunft dieser meßbaren, ausdifferenzierten Zellen, kann man Rückschlüsse auf die zugehörige Scheitelschicht ziehen. Unumstritten ist die Ploidiegradbestimmung der ersten Scheitelschicht über die Erfassung der Stomatalänge bzw. -breite (SCHWANITZ, 1952/ POHLHEIM, 1983). Die Zählung der Chloroplastenzahl pro Stoma führt zu entsprechenden Ergebnissen (POHLHEIM, 1978/ COMPTON et al., 1996). Weiterhin dienten Messungen der Blattspreite und der Anzahl Stomata pro Flächeneinheit zur Ploidiebestimmung (CHAT et al., 1996).

Weitaus strittiger ist dagegen der Rückschluß von Pollengröße auf den Ploidiegrad der zweiten Scheitelschicht, wenngleich auch diese Methode beschrieben ist. (EMSWELLER und BRIERLEY, 1940/ PRYOR, 1972/ SCHMALZ, 1989). So weist beispielsweise WALTER (1961) auf die hohe Variabilität der Pollengröße hin und SCHWANITZ (1952) erkannte eine Abhängigkeit der Größe vom Alter der Blüte. Aus diesem Grunde wird von verschiedenen Autoren die Zählung der Keimporen am Pollen als sicherer empfohlen (FUNKE, 1956/ WALTER, 1961).

Die Anwendung der indirekten Bestimmungsmethoden zur Ploidie hat zuallererst den Vorteil, leicht und technisch sowie zeitlich unaufwendig handhabbar zu sein. In diesem Zusammenhang wurde in der eigenen Arbeit eine Methode geprüft, über die Zellenanzahl pro Fläche bei Petalenepidermen auf die Ploidiestufe der L1 zu schließen. Diese Variante ist schnell, einfach anzuwenden und erwies sich aufgrund klar voneinander zu unterscheidender Mittelwerte bei einem Stichprobenumfang von ca. 30 Photos als brauchbar. Daraus gewonnene Ergebnisse stimmen mit den mittels anderer Methoden gefundenen Ergebnissen überein. Als statistisch sicher kann diese Methode allerdings nicht gelten, weil wegen sehr hoher Standardabweichungen statistische Mittelwertvergleiche nicht sinnvoll erscheinen. Dies setzt zudem die Anwendbarkeit im Falle heterogener Bestände (z. Bsp. nach Kolchizinbehandlung) erheblich herab; sektorale Ploidieunterschiede können schwer erkannt werden. Andere Methoden wie die Ploidiebestimmung über Stomatamessung sollten deshalb vorgezogen werden.

Interessant ist weiterhin ein methodischer Vergleich, den COMPTON et al. (1996) anhand von Untersuchungen an der Wassermelone anstellten: Ihren Ergebnissen nach eignen sich Ovariendurchmesser, das Verhältnis Laubblattlänge zu -breite und der Antherendurchmesser, wohingegen bei Erfassung des Petalendurchmessers, der Ovarienlänge, Blattlänge und Blattbreite sich zum Teil nicht signifikante Unterschiede zwischen verschiedenploidien

Pflanzen ergaben. Aufgrund starker Abhängigkeit aller genannten Meßmethoden (außer Chromosomen- und Nucleolizählung) von Umweltbedingungen und Ontogenese stadium ist die Forderung nach gleichen Voraussetzungen (Entnahmestellen, Ernährungszustände, Ontogeneseabschnitte) eine entscheidende Grundlage für beabsichtigte Vergleiche (SCHWANITZ, 1952). Bei allen indirekten Meßmethoden, bei denen aufgrund größerer Zellen auf einen höheren Ploidiegrad geschlossen wird, muß zudem beachtet werden, daß artspezifisch ein Optimum der Ploidiegrade existiert. Wie LEVAN und ELLIOTT (1958) an *Phleum pratense* L. demonstrieren, nimmt die Höhe der Pflanze bis zur pentaploiden Stufe zu und fällt danach bei weiterer Erhöhung der Chromosomenzahl stark ab. Auch CHAT et al. (1996) konnten aufgrund dieses Sachverhalts tetraploide und pentaploide *Actinidia* Lindl. über Stomatalängen nicht mehr trennen. Hier wird die Grenze der indirekten Methodik deutlich. Eine moderne Variante und gleichzeitig eine Überwindung dieser Grenze ist die Analyse über den DNA-Gehalt der Zellen, der bei Erhöhung der Chromosomenzahl stetig zunimmt. Durch diese cytometrische Methode werden in Häufigkeitsdiagrammen, die auf der Grundlage von unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten erstellt werden, Ploidieunterscheidungen möglich (KAMO und GRIESBACH, 1993/ BARANYI und GREILHUBER 1996/ CHAT et al., 1996/ HOPKINS et al., 1996/ MARTEL et al., 1997). Liegen sektorial-, meriklinal- oder periklinalchimärische Konstitutionen bei Pflanzen vor, können jedoch bei dieser Methodik erhebliche Interpretationsschwierigkeiten bis hin zu Fehldeutungen auftreten, wenn derartige histogenetische Besonderheiten in der Untersuchungsweise nicht berücksichtigt werden. Ein kritischer Habitusvergleich, der diese Möglichkeiten mit einbezieht, sollte daher jeder Untersuchung vorausgehen.

4.2. Zur Stabilität des A1-Gens

Im eingangs dieser Arbeit beschriebenen Freilandversuch kam es zur Auspflanzung heterozygoter Pflanzen mit einer intakten Genkopie. Die während dieses Versuchs aufgetretenen Variabilitäten in der Blütenfarbe (zu denen das Sternmuster zählt) waren bedingt durch Methylierung in der Promotorregion (MEYER und HEIDMANN, 1994/ MEYER, 1995 B). Bislang ist hauptsächlich die eine Richtung der Instabilität, nämlich die Methylierung, Gegenstand von Untersuchungen gewesen. An der Spreitelung vormals weiß blühender Pflanzen ist ablesbar, daß Methylierung auch wieder aufgehoben werden kann. Dieser Mechanismus ist ebenso interessant, weil er einen entscheidenden Teil der Instabilität des A1-Gens betrifft. Nicht nur die Inaktivierung, sondern auch die Reaktivierung des A1-

Gens bedeutet Instabilität dieses Farbgens. In der Literatur sind Methoden zur künstlichen Reaktivierung von Transgenen beschrieben, so möglich mit dem Methylationsinhibitor 5-Azacytidin (VAN SLOGTEREN et al., 1984).

Methylierung führt also zur Blockade des A1-Gens. Sprenkelung und Sektorbildung sind (A) → A - Ereignisse unterschiedlichen Ausmaßes. Abhängig vom Stadium der Gewebeentwicklung, in der es zur Blockade bzw. Deblockade des A1-Gens kommt, bilden sich im Falle der Deblockade kleine rote Bereiche (Sprenkel) bei relativ späten bzw. größere rote Bereiche (Sektoren) bei früheren Stadien der Blütenbildung. Die Sprenkelung ist dabei offenbar das weitaus häufigere Ereignis. Erfasst diese Veränderung solch große Bereiche, daß beispielsweise eine Blockade des A1-Gens für eine gesamte Scheitelschicht manifest wird, entsteht bei A1-Blockade in der ersten Scheitelschicht für die Blüte ein Sternmuster, wie es in dieser Arbeit analysiert wurde. Wie der über fünf Jahre erhaltene Klonbestand zeigt, ist die Veränderung einer ganzen Scheitelschicht relativ stabil. Rot bzw. weiß blühende Sprosse, die gelegentlich an Stern/DDD entstehen, könnten als Entmischungsprodukte aufgrund einer Schichtenverdrängung (L1- Perforation bzw. - Reduplikation) aufgefaßt werden. Denkbar ist aber auch die Aufhebung der Deblockade in L1 im Falle rotblühender Sprosse, eine Blockade in L2 hingegen beim Auftreten weißer Blüten. Auch an dieser Stelle liefert die doppelte Markierung einen Analyseweg. So beweist der Fall der Ploidiechimäre Stern/TDD, daß Schichtenverdrängung stattfindet: An ihr auftretende weiß blühende Sproßvarianten besaßen homohistisch tetraploide Petalen, L1 hat hier subepidermales Gewebe verdrängt. Über L3 kann dabei keine Aussage getroffen werden, da nur Petalengewebe untersucht wurde. Rot blühende Sprosse, die bei einer L1-Perforation (L2-bürtiges Gewebe gerät in L1-Position) homohistisch diploid, bei Aufhebung der Blockade hingegen die ploidiechimärische Konstitution beibehalten müßten, traten an Stern/TDD nicht auf. Dieses vergleichende Ergebnis erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß einheitlich weiß (bzw. rot) blühende Sprosse an Stern/DDD ihre Ursache in L1-Reduplikation (bzw. -Perforation) haben.

Im Gegensatz zum Sternmuster ist die Sprenkelung eine sehr variable, unmittelbar von Umweltbedingungen (Licht und Temperatur) abhängige Erscheinung. Interessant ist in dieser Verbindung, daß in den weißen Sektoren der Sterne keine Sprenkelung ausgemacht werden kann. Isoliert man hingegen über Kalluskultur die erste Scheitelschicht und macht sie zur Grundlage eines Pflanzenbestandes, ist Sprenkelung zu beobachten, die zudem eindeutig typenbedingt ist. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist anzunehmen, daß Sprenkelung und Sternmusterbildung generell gleiche Ursache, nämlich Blockade bzw. Deblockade des A1-Gens haben. Da die Instabilität des A1-Gens eine generelle potentielle Eigenschaft der

transgenen Petunien ist, die auch vererbt wird, ist es erklärbar, daß sich neu an sonst weiß blühenden Pflanzen (diploid und tetraploid) wie auch an weiß blühenden Sämlingen, die das A1-Gens in inaktiver Form [(A) –] besitzen, Sprosse mit Sternmusterblüten bilden. Damit wird zwar nicht das Sternmuster vererbt, aber die Fähigkeit zur Bildung desselben. Sonstige bekannte chimärische Blütenmuster haben in diesem Punkt eine andere Charakteristik. Die auf beispielsweise eine Schicht beschränkte Farb-Defektmutation ist bei ihnen ein einmaliger Vorgang (*Saintpaulia*, *Verbena*, *Pelargonium*: siehe 1.3.). Der Farbdefekt einer Scheitelschicht ist ein Verlust, der sehr unwahrscheinlich rückgängig gemacht werden kann. Bei der transgenen Petunie aber ist aufgrund der Instabilität des Farbgens A1 auch der Umkehrweg der Sternbildung praktikabel, auch kann der Weg der Sternbildung an rot bzw. weiß blühenden Pflanzen ständig neu vonstatten gehen. Bildet sich ein solcher Stern, ist das offenbar eine relativ stabile Konstruktion, die deshalb auch lange vegetativ erhalten werden kann.

Aufgrund des modifikativen Charakters dieser Blütenfarbchimären, die ihre Musterbildung nur einer Blockade des Farbgens durch Methylierung, nicht jedoch einem irreversiblen Gendefekt verdanken, muß ein neuer Begriff geprägt werden: Es wird vorgeschlagen, für derartige Pflanzen den Begriff „**epigenetische Periklinalchimäre**“ zu gebrauchen. Nur scheinbar liegt eine Farbdefektmutation vor, sie ist weiter nichts als eine epigenetisch bedingte, reversible Veränderung (Methylierung) des für die Blütenfarbe verantwortlichen Gens. Daß diese Chimärenform nicht losgelöst von anderen Blütenfarbchimären bzw. Blütenfarbvariationen existiert, sondern in einem logischen Kontext mit ihnen steht, wurde unter 3.9. durch Vorstellung von und Untersuchungen an weiteren auffälligen Blütenfarbmustern erörtert.

Erwähnt werden muß an dieser Stelle eine Arbeit über Tabak von MATZKE und MATZKE (1990), in der von einer „epigenetischen Chimäre“ die Rede ist. „Epigenetische Chimäre“ beschreibt hier lediglich die Tatsache, daß ein transferiertes Resistenzgen (Kanamycinresistenz) sowohl in aktivem wie auch inaktivem Zustand in ein und derselben Pflanze vorliegt. Die mit Methylierung verbundene Instabilität des transferierten Gens ist offensichtlich eine Eigenschaft dieses Gens innerhalb aller Sproßscheitelschichten bzw. der von ihnen abstammenden Gewebe und erscheint zellgebunden in einem willkürlichen Muster. Zudem ist diese Instabilität vererbbar. (Es könnte in diesem Sinne die weiß-rot gesprenkelte, transgene Petunie als vergleichbar angesehen werden.) Diese Pflanze als Chimäre zu bezeichnen, ist auch mit dem Adjektiv „epigenetisch“ fragwürdig, weil die Voraussetzungen für das Vorhandensein einer chimärischen Konstitution im bisherigen Verständnis von

chimärischen Koexistenzen innerhalb einer Pflanze nicht gegeben sind, auch nicht in einem sektorialchimärischen Sinn. Dazu erscheint die zu phänotypischen Veränderungen führende Geninstabilität zu wechselhaft; Sektorenbildung kann auch hier allenfalls als eine besondere (weil ontogenetisch früher einsetzende) Form der Sprenkelung verstanden werden.

An diesem Punkt erscheint eine weitere begriffliche Abgrenzung angebracht: BERGANN (1967) verwendet den Begriff Chimäroide für Heterohistonten, die außerhalb ihrer Sproßspitze, also extrapikal genetisch abgeänderte Zellen bzw. Gewebe besitzen. Auf MATZKEs Tabakpflanze ist dieser Begriff in zweierlei Hinsicht nicht übertragbar; erstens treten hier auch intraapikal Instabilitäten des transferierten Gens auf und zweitens handelt es sich nicht um eine genetische, sondern lediglich epigenetische Veränderung, die reversibel ist. Die mosaikartige Erscheinung bei dieser Tabakpflanze muß zudem abgegrenzt werden von makulaten Mustern von Laubblattvarianten, die ihre Ursache in der Existenz von Mischzellen (Nebeneinander von mutierten und unmutierten Plastiden in einer Zelle) haben. Je nachdem, in welcher Form sich die Zellteilung vollzieht, verteilen sich mutierte und unmutierte Plastiden in die Tochterzellen. Dabei ist eine Separation in gänzlich mutierte bzw. unmutierte Zelltypen theoretisch und praktisch möglich. Ihre histologische Anordnung wiederum führt zu verschiedenen Musterungen.

Zuletzt muß noch auf vererbliche Mosaik- bzw. Scheckungsmuster hingewiesen werden, wie sie bspw. von *Tropaeolum majus albopulverum* (KIRK und TILNEY-BASSETT, 1967) oder bei *Petunia hybrida albomutabilis* (siehe 3.8.) bekannt sind.

In diesem begrifflichen Rahmen kann die beschriebene Tabakpflanze histologisch/histogenetisch nur als ein mosaikartiges Nebeneinander von Zellen mit unterschiedlichen Methylierungsgraden und damit einer differentiellen Geninstabilität des Transgens charakterisiert werden. Im eigenen Verständnis berechtigt erst die den „klassischen Chimären“ entsprechende relativ stabile Musterung, wie sie beispielsweise beim Auftreten des Sternmusters an der transgenen Petunie zu beobachten ist, zur Anwendung des Chimärenbegriffs, hier als „epigenetische Periklinalchimäre“. Überträgt man MATZKEs Ansicht auf die transgene Petunie, müßte weiß/diploid mit der Fähigkeit zur Sprenkelung als „epigenetische Chimäre“ interpretiert werden. Sie ist zwar die Vorstufe zur Bildung der „epigenetischen Periklinalchimäre“, hat aber analog zu MATZKEs Tabakpflanze nicht unbedingt Eigenschaften zu sonst als Sektorial- oder auch Meriklinalchimären bezeichneten Formen.

Vielmehr ist bei MATZKE mit Chimärie die der transformierten Tabakpflanze eigene, willkürlich erscheinende Instabilität eines transferierten Gens gemeint. Den Begriff

„epigenetische Chimäre“ in diesem Zusammenhang zu gebrauchen, erscheint aufgrund der üblichen Begriffsverwendung und des hier vorliegenden Sachverhaltes als nicht ratsam. Als „Musterbildung unterschiedlichen Ausmaßes aufgrund der Instabilität eines transferierten Gens“ ist es möglicherweise besser, wenn auch ausführlicher bezeichnet.

- **Stabilität des A1-Gens in Kreuzungsanalysen**

Die Instabilität des A1-Gens ist auch auf der generativen Ebene ein Faktor, der zu Blütenfarbveränderung der Sämlingsnachkommenschaft und damit zu veränderten, von den Mendelschen Regeln abweichenden Aufspaltungsverhältnissen führt.

Bei Kreuzungen von Pflanzen mit inaktiviertem A1-Gen und Pflanzen, die das A1-Gen in aktivem Zustand besitzen, ist eine Übertragung des Methylyationsmusters vom „inaktiven“ auf den „aktiven“ Partner denkbar, so im Falle der Kreuzung von weiß/diploid x Stern/DDD (Gametenbildung von der zweiten Scheitelschicht: A1-Gen aktiv). Bei Selbstung homozygot roter Pflanzen entstehen jedoch ebenfalls weiß blühende Nachkommen und zahlreiche instabile Farbmuster. Hier müssen andere Methylyationsvorgänge einsetzen, da beide Selbstungspartner das A1-Gen in sichtbar aktivem Zustand besitzen.

Als Übertragung von Methylyationsmustern hat MEYER (1995, A) den Vorgang beschrieben, wenn ein unmethyliertes Allel mit einem methylierten zur Paarung gelangt. Das unmethylierte Allel kann dabei inaktiviert, also ebenfalls methyliert werden. Diese Transinaktivierung (ODENBACH et al., 1997) wurde von MEYER et al. (1993) als der Paramutation ähnlich bezeichnet.

Der Begriff Paramutation wurde in Hinsicht auf eine allelspezifische Interaktion beim Mais eingeführt (BRINK 1973). Dabei verändert sich das Allel B (für Anthocyanbildung verantwortlich), wenn es mit dem Allel B' bei Kreuzung aufeinandertrifft, zu B'. Die spontane Umkehrung dieses Vorgangs, also B'→B, konnte bislang nicht beobachtet werden (PATTERSON, 1993).

Für den Fall der transgenen Petunie jedoch ist die Umkehrung von (A) zu A charakteristisch, d. h. auch, daß die Nachkommenschaft bei Kreuzung von weiß [homozygot: (A)(A)] x rot [homozygot: A A] nicht nur aus weiß blühenden Pflanzen aufgrund „paramutationsähnlicher“ Übertragung des Methylyationsmusters, sondern auch aus rot und variabel blühenden Nachkommen besteht (MEYER et al., 1993). Auch wenn der Paramutation in anderen Fällen ein metastabiler Charakter zugebilligt wird, Variabilität in der Allelbeeinflussung (einschließlich der Nachkommenschaft) also der Paramutation eigen sein kann (JORGENSEN, 1994), erscheint wegen der noch sehr unklaren Ursachen und

Zusammenhänge für dieses Phänomen der von SABL und LAIRD (1992) geprägte Begriff „epigene Konversion“ sinnvoll. Für den Fall der Petunie könnte er so verstanden werden, daß der Allelstatus des inaktiven Allels in einem epigenetischen Sinn auf das aktive Allel übertragen werden kann, wodurch dieses ebenfalls inaktiviert wird. Diese Veränderung muß dabei nicht stabil in der Nachkommenschaft zu finden sein, ebenso wenig sich auf vegetativem Wege erhalten (wie die bisherigen Untersuchungen zur transgenen Petunie gezeigt haben).

MATZKE (1994) befürwortet die Verwendung des mehr allgemein gehaltenen Begriffs „epigene Konversion“, zumal Inaktivierungsprozesse von Trans- wie von endogenen Genen nicht ausreichend aufgeklärt sind.

Verschieden hohe Abweichungen von der Mendelschen Aufspaltung und die Häufigkeit instabiler Nachkommen, je nachdem, ob Selbstung/Kreuzung und Aussaat/Bonitur im Sommer oder Winter erfolgte, machen die Umweltabhängigkeit deutlich. Selbst bei Nachkommenschaft homozygot „roter“ Pflanzen treten weiße und instabil rot blühende Typen auf. Unterschiede insbesondere bei diesen Pflanzen suggerieren, daß es zur Sprenkelung neigende Typen gibt, die diese Veranlagung auch auf generativem Wege weitergeben. Die Existenz von zur Sprenkelung neigenden Typen wurde auch aus der Bonitur des Kallusregeneratbestandes von weiß/diploid und weiß/tetraploid geschlußfolgert.

• **Stabilität des A1-Gens in Sorteneinkreuzungen**

Im Gegensatz zu zwei publizierten Einkreuzungsversuchen (siehe auch 3.7.) konnte festgestellt werden, daß Instabilitäterscheinungen in der Blütenfarbe (Sektorbildung, Sprenkelung) in F1- und F2- Generationen wahrscheinlich bleiben. Ihr Ausmaß ist relativ gering, aber auffällig. Der Farbdefekt überträgt sich dabei offensichtlich auch auf die Farbkomponenten des (blauen) Kreuzungspartners (‘Marathon Dunkelblau’). Sektoren haben demzufolge neue Farbwerte, dazu die von transgen/rot und der blauen Sorte bis hin zum völligen Farbausfall (weiß). Die Übertragung des Methylierungsmusters auch auf andere Farbgene wäre eine Interpretationsmöglichkeit.

Im eigenen Kreuzungsversuch unklar ist die fehlende Aufspaltung der F1. Nach einer Überprüfung der Handelssorte ‘Marathon Dunkelblau’ durch Selbstung stand fest, daß es sich um eine in Hinblick auf die Blütenfarbe homozygote Ausgangsbasis handelt. Von dem transgenen roten Typ ist sein heterozygoter Zustand bekannt. Die F1 bestand einschließlich Reziprokkreuzung aus einheitlich dunkelrosa blühenden Pflanzen, lediglich ein hellerer Typ (hellrosa) befand sich darunter. Eine 1:1-Farbtyp-Aufspaltung jedoch wäre nach MENDEL zu

erwarten.

Es ist wahrscheinlich, daß bei diesen dunkelrosa Farbtypen die Farbstoffsynthese nicht alleinig in Richtung Anthocyanidin wie bei der transgenen Petunie fortgesetzt wird, sondern aufgrund entsprechender Gene der eingekreuzten Sorte in Richtung blauer und roter Farbstoffe abgeleitet wird. Das in der Farbstoffkette gebildete Dihydroflavonol wird also nicht nur weiter zu Dihydrokaempferol, sondern verstärkt auch in Richtung Dihydromyricetin und Dihydroquercetin umgewandelt, was zur Fortsetzung anderer Farbstoffsynthesen und letztendlich zur Bildung von Delpinidin- und Cyanidinderivaten führt.

Der hellrosa Farbtyp (eine Pflanze) wie auch die Farbsektoren könnten als Defekte interpretiert werden, die zur partiellen oder vollständigen Unterbrechung der Farbstoffsynthesen führen.

Negativ wirkt sich auf Erklärungsansätze die Tatsache aus, daß der genetische Hintergrund zur Farbstoffsynthese bei 'Marathon Dunkelblau' nicht ausreichend bekannt ist. Einkreuzungen der transgenen Form mit genetisch definierten Sorten sollten deshalb weiterer Untersuchungsgegenstand sein, weil die Einbeziehung transgener Pflanzen in die klassische Pflanzenzüchtung der entscheidende Punkt ist, wenn es um die Anwendung molekularer Methodik geht.

4.3. Betrachtungen zur Gewebek Konkurrenz

Anhand des Phänotyps der Sterne und des Hintergrundwissens über ihre Scheitelkonstitution (Ploidiestufen) lassen sich Überlegungen zur Gewebek Konkurrenz anstellen:



Abb.86:
zwei Homohistonten:
Stern/TTT und
Stern/DDD,
(von links nach rechts)



Abb.87:
zwei Ploidiechimären:
Stern/TDD und
Stern/DP?
(von links nach rechts)

Die stabile Schichtung von „rotem“ und „weißem“, diploidem und tetraploidem Gewebe macht jeweils beide Komponenten zu Partnern, zwischen denen sich ein Kräfteverhältnis herausbildet. Je nachdem, zu welcher Schicht hin dieses Verhältnis verschoben ist, kommt es zu typischen Musterausprägungen. SCHNEIDER (1995) spricht in diesem Zusammenhang von „sporophytischer Balancierung“, ein Begriff, der den Zustand stabil geschichteter

Periklinalchimären treffend beschreibt. Gleichmaßen wird mit diesem Begriff der Vorgang erfaßt, der zu Verschiebungen im Verhältnis von roten zu weißen Blütenanteilen durch Polyploidisierung einer Scheitelschicht zustande kommt. Begriffe, wie sie aus der Literatur bekannt sind: „Diplontische Selektion“ (GAUL, 1959) und „Diplontische Drift“ (BALKEMA, 1972) erweisen sich für solche stabil geschichteten Chimären, wie die Sternform der transgenen Petunie eine ist, als ungeeignet.

Die polyploidisierte L1 führt bei Stern/TDD (im Vergleich zu Stern/DDD) zur Vergrößerung der weißen Sektoren durch stärkere Beteiligung dieser Scheitelschicht am Randmesophyll des Kronblattes. Ist die zweite Scheitelschicht polyploid, kehrt sich dieser Effekt um, die weißen Sektoren bei Stern/DP? sind auffällig klein.

Bei den beiden Ploidie-Homohistonten Stern/DDD und Stern/TTT bleibt das Flächenverhältnis rot:weiß ungefähr gleich, nur werden im Falle Stern/TTT die Blüten generell größer. Tetraploides Gewebe scheint bei *Petunia* diploidem gegenüber bevorteilt zu sein, was offenbar nicht durch eine höhere Teilungsfrequenz (im Gegenteil: bei tetraploidem Gewebe verlangsamt sich die Teilungsgeschwindigkeit: SCHEIBE, 1951/ SCHMALZ, 1989/ SCHNEIDER, 1995), sondern allein durch die größeren Zellen, die pro Zeiteinheit größere Volumina ergeben, bedingt ist. Neben dieser Ursache sind auch veränderte Druckverhältnisse bei Ploidiechimären als Grund für mögliche veränderte Teilungsmodi denkbar (KNY, 1902/ LINTILHAC, 1974/ SCHNEIDER, 1995). Ebenfalls sollte beachtet werden, daß ein Optimum für die Ploidiestufe existiert, welches artspezifisch ist (SCHMALZ, 1989). Höherploide Scheitelschichten haben deshalb nicht unbedingt einen erhöhten Gewebeanteil an den Organen.

Bei den Zellenzählungen/Petalenepidermis zur Ploidiebestimmung (siehe 3.2.) fiel auf, daß die Zellen bei Stern/TDD im weißen Randbereich größer sind als im roten Binnenfeld. Da der Rand homohistisch tetraploid, das Binnenfeld aber aus einer Schichtung von tetraploidem über diploidem Gewebe besteht, lag die Vermutung nahe, daß für letzteren Fall eine Verringerung der Zellgröße durch das unterlagerte diploide Mesophyll (mechanische Beeinflussung oder partnerinduktive Wirkung?) bedingt wird. Um das zu testen, wurden vergleichende Untersuchungen an Stern/DDD durchgeführt mit einem dem Stern/TDD analogen Ergebnis: Auch hier sind die Epidermiszellen im weißen Rand größer als im roten Binnenfeld der Petalen.

Die auf 34 Photos pro Variante abgebildeten Zellen wurden ausgezählt und ergaben beispielsweise für die obere Petalenepidermis:

Stern/TDD:	rot: 102 / weiß: 94,
Stern/DDD:	rot: 188 / weiß: 178 Zellen.

Mit diesen Zahlen (einschließlich hoher Standardabweichungen: Werte von 6,7-12,5) sind die Unterschiede allenfalls lagebedingt und haben keine Ursache im Sinne einer Gewebekonkurrenz aufgrund verschiedener Ploidiestufen. Statistische Testverfahren konnten wegen der hohen Standardabweichungen nicht angewendet werden, jedoch wird der Sachverhalt bereits qualitativ erfaßbar.

Ein lohnendes Untersuchungsgebiet über Gewebekonkurrenz wären die aus in-vitro-Kalluskultur hervorgegangenen Laubblattvarianten (siehe Farbtafel I). Die Ploidiemarkierung einzelner Schichten ausgesuchter Typen der Laubblattvarianten und eventuell flow-cytometrische Untersuchungen würden hier eine sinnvolle Vergleichsebene schaffen, um Gewebekonkurrenz weiter zu charakterisieren!

4.4. Versuchsansatz und Teilergebnisse zur Klärung partnerinduktiver Wirkungen

Das Phänomen der Partnerinduktion ist zur Erklärung des Sternmusters der transgenen Petunie herangezogen worden und konnte bestätigt werden. Während BRABEC (1965) noch über die Untersuchungen von BERGANN (1961) an *Euphorbia pulcherrima* Willd. 'Eckes Rosa' als einzig „einwandfreien Fall einer Partnerinduktion“ berichtet, haben sich bis heute zahlreiche weitere, eindeutig belegte Beispiele gefunden (siehe 1.3.). Die Wirkungsweise der Partnerinduktion konnte dabei jedoch nie geklärt werden. Lediglich Vermutungen wurden aufgestellt, wonach sie als „zwischenzellige Genwirkung“, „Diffusion von Stoffwechselprodukten von einer Zelle in eine andere“ (RÖSSEL, 1990) oder „genphysiologische Wechselbeziehung“ (BRABEC, 1965) grob charakterisiert wird. Das Modell von *Euphorbia* geht davon aus, daß Cofermente aus L2-bürtigem Gewebe in L1-bürtiges Gewebe diffundieren und dort in Zusammenspiel mit einem Apoferment die verhinderte Farbsynthese als Reparation eines vorliegenden Defektes wieder ermöglichen (BERGANN, 1961). Mutmaßungen darüber, was von einer Chimärenkomponente in die andere übergeht, haben bis heute für Diskussionen - insbesondere im Falle von Pfropfchimären gesorgt. Ein Genübertritt von einer Schicht in eine andere konnte jedoch nie nachgewiesen werden, Wirkungen bleiben auf eine physiologische Ebene beschränkt, wie bereits eine, in der Geschichte der Chimärenforschung frühe Arbeit von WINKLER (1912) umfassend darstellt. Der bei *Petunia* genau bekannte Syntheseweg der Blütenfarbstoffe, speziell der der Anthocyansynthese, ermöglicht einen Ansatz, der - wenn auch auf indirektem Wege - zur Klärung des Wesens partnerinduktiver Wirkungen beitragen kann.

Von der weiß blühenden Petunie ist bekannt, daß sich in ihren Blütenblättern, maßgeblich dabei in den Zellen der oberen Epidermis, Dihydrokaempferol, eine Vorstufe zur Bildung von Pelargonidin, anreichert (Zudem sind Cyanidin- und Delphinidinderivate in den Epidermiszellen in Spuren nachzuweisen.). Pelargonidin kann nicht synthetisiert werden, da den Petunien eine Reduktase (Enzym) fehlt, die in der Lage ist, Dihydrokaempferol zu Pelargonidin zu reduzieren (MEYER et al., 1987/ FORKMANN, 1991). Das vom Mais in die Petunie transferierte A1-Gen codiert diese Reduktase, die Pelargonidinsynthese wird möglich. Nun ist bereits nachgewiesen, daß das Sternmuster, welches als eines der Produkte dieses genmanipulatorischen Versuchs entstand, eine chimärische Konstitution aufweist. Diese Pflanze setzt sich zusammen aus einer genetisch weißen Schicht (L1) und genetisch roten Komponenten (L2 / L3). Im Binnenbereich der Petalen wird in der eigentlich farbdefekten L1-bürtigen Epidermis Farbstoff (Pelargonidin) induziert. Diese Wirkung geht von der

unterliegenden L2-bürtigen Zellschicht (Mesophyll) aus und wird als Partnerinduktion beschrieben (Nachweis dieses Sachverhaltes unter 3.2.).

Aus den Untersuchungen über das Wesen des Farbdefektes ist bekannt, daß das A1-Gen nicht verschwunden, sondern blockiert ist (Sprenkelung an den weißen L1-bürtigen Entmischungsprodukten weiß/diploid und weiß/tetraploid). Weiterhin zeigten die Versuche zur Kalluskultur von Laubblattexplantaten der Sternmuster, daß Regenerate fast ausschließlich von L1 abstammen und in der Regel den farbdefekten Charakter beibehielten, also weiße Blüten ausbildeten.

In den Laubblättern jedoch ist das A1-Gen nicht von Interesse. Zum Zeitpunkt der Blütenentwicklung wird dieses Gen in Hinsicht auf die Anthocyansynthese aktiv. Erst zu diesem Zeitpunkt auch können Wirkungen, die mit diesem Gen und der Blütenfarbausbildung zusammenhängen, bedeutsam werden. Aus diesen Tatsachen ergeben sich zwei theoretische Möglichkeiten, die zu den beschriebenen partnerinduktiven Wirkungen führen können:

Hypothese 1:

Das Mesophyll des Kronblattes (L2-bürtig) bewirkt in den Zellen der ihr überlagerten Epidermis die Aufhebung der Blockade (Methylierung) des A1-Gens. Eine Regeneration über Kalluskultur von Kronblättern aus dem chimärischen Teil, also dem roten Binnenfeld der Petale, ergäbe damit im Falle der Ploidiechimäre Stern/TDD tetraploide, rot blühende Pflanzen bei der anzunehmenden Regeneration aus epidermalem Gewebe. (Jedoch sollte bedacht werden, daß mit der Umwandlung ausdifferenzierten Petalengewebes in meristematisches Kallusgewebe die Deblockade wieder rückgängig gemacht werden könnte. In diesem ganz speziellen, aber bei Einbeziehung aller theoretischen Möglichkeiten denkbaren Fall wird eine Interpretation schwierig.)

Hypothese 2:

Sind die Kallus-Regenerate tetraploide, weiß blühende Pflanzen, dokumentieren also den Erhalt des farbdefekten Genzustandes der ersten Scheitelschicht, so ist es sehr wahrscheinlich, daß lediglich ein Stoffwechselprodukt, welches von den genetisch intakten Mesophyllzellen (L2) in die Epidermiszellen diffundiert, zu den partnerinduktiven Wirkungen führt. Von den Pflanzen der weißen Petunienlinie (gemeint ist die Ausgangslinie vor dem Gentransfer), die dann in bezug auf ihre Farbstoffsynthese diesen weiß blühenden Kallusregeneraten entsprechen würden, wissen wir, daß die Pelargonidinsynthese mit Dihydrokaempferol abbricht, da die notwendige Reduktase fehlt. Es kann also mit großer Wahrscheinlichkeit

vermutet werden, daß in diesem zweiten Falle zum Zeitpunkt der Blütenentwicklung im L2-bürtigen, intakten Mesophyll diese Reduktase gebildet wird und in die Zellen der Epidermis gelangt. Die durch Blockade des A1-Gens nicht mögliche Pelargonidinsynthese kann in diesen Zellen fortlaufen. Denkbar jedoch ist gleichermaßen ein Stofftransfer aus der fortgeschrittenen Farbstoffsynthese, so zum Beispiel der Übertritt von Leucoanthocyanidin aus dem Mesophyll in epidermales Gewebe.

Abweichungen wegen einzelner (A) \longleftrightarrow A-Ereignisse sind zu erwarten, weshalb ein großer Stichprobenumfang zur Prüfung der Hypothesen nötig ist. Ein Kontrollversuch mit Petalenexplantaten von weiß/tetraploid würde die Sicherheit einer Entscheidung zugunsten einer der beiden Hypothesen erhöhen.

Zum Versuch:

Die in-vitro-Vermehrung über Kalluskultur von Petalensegmenten ist eher die Ausnahme. Beispielsweise wird eine solche Methode für *Rosa hybrida* L. (MURALI et al., 1996) beschrieben. Für *Petunia* finden sich in der Literatur nur Angaben über in-vitro-Kultur von Antheren, Sproßspitzen, Wurzeln, Laubblättern, Sämlingen, Ovarien, Pollen und Stengelstücken (DIXON, 1985/ GEORGE, 1987). Im eigenen Versuch war über die im Methodik-Teil dieser Arbeit beschriebene Prozedur erstaunlich einfach eine gute Kallusent-

wicklung zu erreichen. Der Kallus hielt sich über Wochen, ohne daß wie beim Kallus aus Laubblattexplantaten eine Sproßentwicklung einsetzte. Aus diesem Grunde wurde mit verschiedenen Medienzusammensetzungen und einem Neuanatz über ein Jahr lang in Folge weiterexperimentiert:

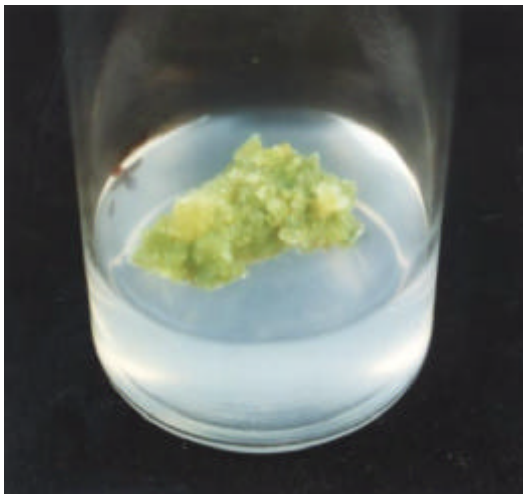


Abb.88: Kallus aus Petalensegment

Numerierung / Bemerkung	Grundmedium	Hormonzusatz pro Liter	Hormonzusatz pro Liter
1.	½ MS	4mg BAP	
2.	½ MS	2mg IBA	1mg Kinetin
3.	½ MS		
4. Photo	½ MS	0,3mg 2,4 D	3mg Kinetin
5.	½ MS	0,5mg IES	1mg Kinetin
6.	½ MS	1mg IES	3mg Kinetin
7.	½ MS	0,5mg IES	3mg 2iP
8.	½ MS	4mg IES	3mg Kinetin
9.	½ MS	0,6mg 2,4 D	6mg Kinetin

Die ersten drei Medien ausgenommen konnte sich Kallus ausgesprochen gut entwickeln und über erstaunlich lange Zeiträume (mehrere Wochen) ohne Umsetzen erhalten werden. Teilweise ergrünte der Kallus, niemals jedoch konnte das Ziel, eine Sproßbildung erreicht werden. Es sollte die bereits bis zu diesem Punkt vorangebrachte Analyse dringend weitergeführt werden, weil aufgrund der sowohl biochemisch als auch genetisch klaren Farbstoffsynthese bei der transgenen Petunie und der nun geklärten chimärischen Konstitution der Sternmusterform endlich konkrete Untersuchungen zu den Wirkprinzipien der Partnerinduktion ansetzen können. Dabei sollten die beiden aufgestellten Hypothesen Prüfungsgrundlage sein.

4.5. Überlegungen zur somaklonalen Variation

Nach in-vitro-Kalluskultur an Laubblattexplantaten kam es zur Bildung zahlreicher Varianten, die durch abweichende Blüten, Wuchs und Laubblattmerkmale auffielen. Sie sind unter 3.8. dokumentiert. Für die Blütenvarianten, worunter sich Gigas und Zwergwuchs befinden, sind genetische Defekte sehr wahrscheinlich (SINK, 1984). Die fehlende Fruchtbarkeit dieser Typen unterstreicht das. Bei den Laubblattvarianten führten Chlorophylldefekte unterschiedlicher Stärke in verschiedenen Scheitelschichten sowie Reduplikationen und Perforationen zu vielfältiger Musterbildung. Dabei ist die Beteiligung der ersten Scheitelschicht am Randmesophyll auffällig. Im Gegensatz zu Monokotylen gilt das bei Dikotylen eher als Ausnahme (BERGANN, 1954 und 1955/ POHLHEIM, 1971/ POHLHEIM und KAUFHOLD, 1985/ TILNEY-BASSETT, 1986), die L1 bildet meistens nur epidermales Gewebe.

Die Gewebe der Kelchblätter werden bei *Petunia* von L1 und L2 gebildet, wie das aus den Musterbildern ablesbar ist. Perikline Teilungen in L1 im Kelch von *Petunia*, die zu einer Beteiligung dieser Scheitelschicht am Randmesophyll führten, konnten bereits von RISCHKOW (1936) gefunden werden. Analog berichtet zum Beispiel POHLHEIM (1971) im Zusammenhang mit immerspaltenden Periklinalchimären über eine regelmäßige L1-Beteiligung am Kelchblattrand bei *Mentha arvensis* L., so daß regelmäßige perikline Teilungen der L1 bei der Kelchblattentwicklung zu vermuten sind. Die vielen unterschiedlichen, hier beschriebenen Laubblattmuster sowie das Sternblütenmuster von der transgenen Petunie lassen ausschließen, daß eine Beteiligung von L1 am Randmesophyll aufgrund von Anomalien bestimmter Scheitelschichten zustande kommt.

L1-Randbeteiligung an Laub- Kelch- und Kronblatt ist für *Petunia hybrida* als spezifisch zu betrachten.

Bildung von Sternblütenmustern ist auch an Laubblattvarianten möglich, wie bei G HGG G (grün-hellgrün/wachstumsgehemmt-grün) aufgetreten. Hier gibt es Merkmalskopplungen von Chlorophyllgehalt und Blütenfarbe, die zur Chimärenanalyse genutzt werden können, weil sie eine Form von doppelter Markierung sind. Das umfangreiche Gefüge zahlreicher Laubblattvarianten (Farbtafel I) ermöglicht Untersuchungen zur Gewebekonkurrenz, die u.a. in Hinblick auf verschiedene Chlorophyllgehalte einzelner Schichten geführt werden sollten. Da die Typenvielfalt so groß ist, gibt es eine gute Vergleichsbasis. Desweiteren sind aus solchen Analysen histologische Aussagen zur Ontogenese des Laubblattes zu erwarten.

5. Zusammenfassung

- Das infolge eines Gentransfers entstandene Sternmuster der ziegelrot blühenden Petunie konnte auf eine chimärische Konstitution zurückgeführt werden.

Die Instabilität des A1-Gens in der Petunie resultiert in einen Farbstoffausfall in der alleinig farbstoffführenden Epidermis, die von der ersten Scheitelschicht (L1) des Sproßscheitels gebildet wird. Subepidermale Gewebe können als genetisch intakt im Sinne einer potentiellen Fähigkeit zur Farbstoffsynthese charakterisiert werden. Deutlich wird das unter anderem an den partnerinduktiven Wirkungen, die von subepidermalem, L2-bürtigen Gewebe ausgehen und die Anthocyanbildung in der benachbarten, farbstoffdefekten Epidermis veranlaßt. Da die L1 am Kronblattrand alle Gewebe, also auch das Mesophyll bildet, bleiben diese Bereiche weiß gefärbt. Nur im Binnenfeld der Petalen, wo L2-bürtiges, intaktes Gewebe an die Epidermen anschließt, treten diese partnerinduktiven Wirkungen auf.

Das Resultat ist ein Sternmuster der aus fünf Petalen zusammengewachsenen Kronröhre.

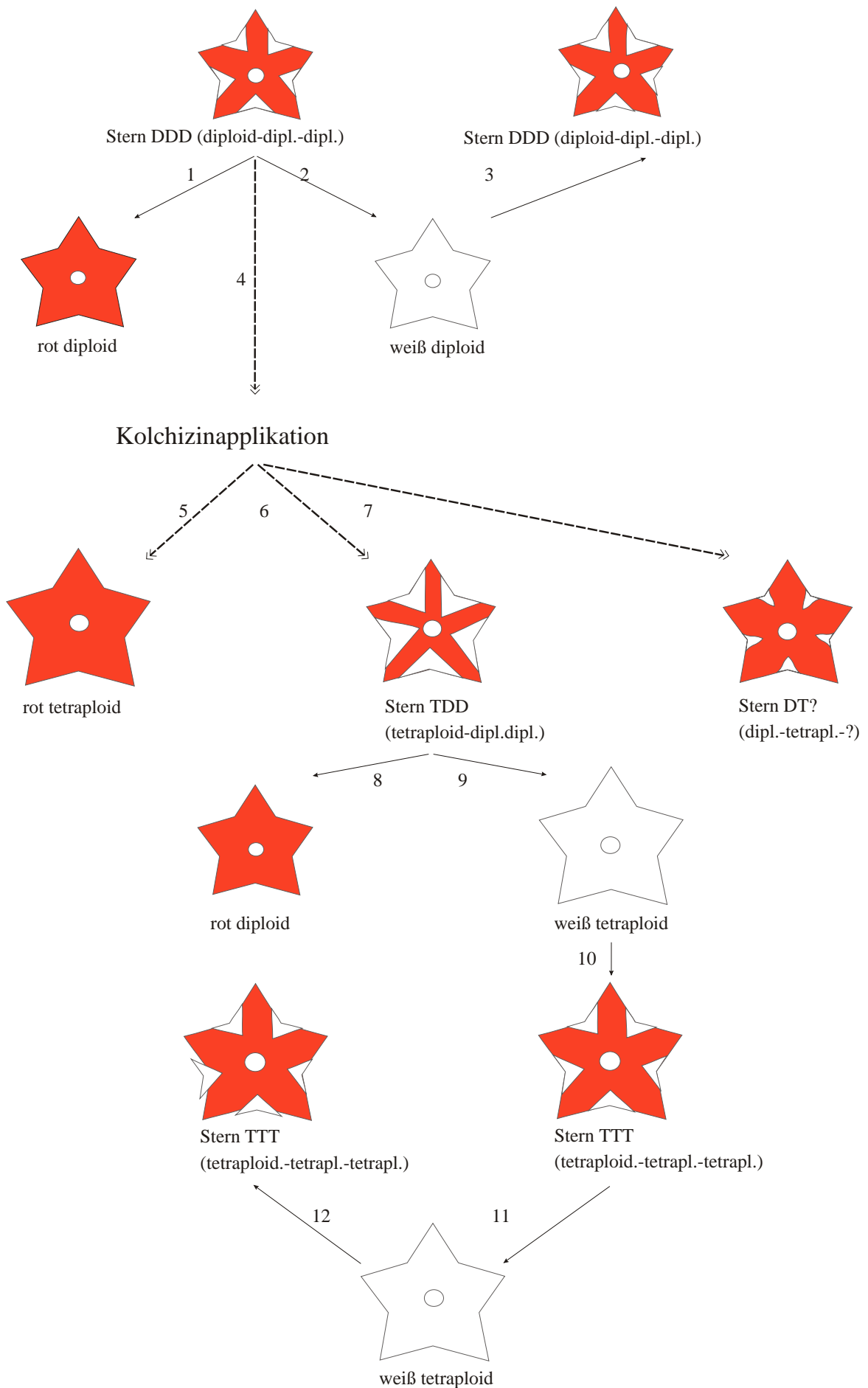
- Spontan und nach in-vitro-Kalluskultur entmischen die Pflanzen in ihre einzelnen Komponenten, so daß rot und weiß blühende Typen entstehen, die mit ihrer Blütenfarbe und ihrem Ploidiegrad (unterscheidbar bei Ploidiemarkierung) die jeweilige Scheitelschicht repräsentieren, von der sie abstammen.
- Bei Kreuzung spaltet die Nachkommenschaft in rot und weiß blühende Pflanzen auf. Aufgrund der Instabilität des transferierten A1-Gens ergibt sich kein Mendelsches Aufspaltungsverhältnis für die Blütenfarbe, wie das dem heterozygotem Zustand entsprechen würde. Auch existieren (wie bei den Entmischungsprodukten) gesprenkelte Blütentypen.
- Die Instabilität konnte als licht- und temperaturabhängig erkannt werden. Sie ist gleichzeitig der Grund dafür, daß sich an weiß blühenden Kallusregeneraten bzw. Sämlingen, die das A1-Gen in inaktiver Form besitzen, ein Sternmuster jederzeit neu bilden kann. Aufgrund dieses modifikativen Charakters dieser Sternmuster-Chimäre wird der Begriff „**Epigenetische Periklinalchimäre**“ vorgeschlagen.
- In Sorteneinkreuzungen konnten Instabilitäten bis in die F2-Generation verfolgt werden, möglicherweise übertragen sich die Ursachen der Farbstoffausfälle der transgenen Form auch auf die Farbkomponente des Kreuzungspartners.
- Verschiedene Ploidiechimären konnten nach einem Kolchizinversuch selektiert werden und dienten in erster Linie als Pflanzen mit doppelter Schichtenmarkierung dem

Chimärenachweis. Anhand dieser Sternmustervarianten können Überlegungen zur Gewebekonkurrenz abgeleitet werden, die schon am Phänotyp sichtbar sind: So erhöht sich mit der Ploidiestufe der L1 auch deren Anteil am Rand des Kronblattes, umgekehrt bei Polyploidisierung der L2.

- Mit dieser Ploidiemarkierung und wegen zahlreicher, nach in-vitro-Kalluskultur entstandener Laubblattchimären kann davon ausgegangen werden, daß die Beteiligung der ersten Scheitelschicht am Mesophyll des Laub-, Kelch- und Kronblattrandes für *Petunia hybrida* spezifisch und nicht Anomalien aufgrund chimärischer Besonderheiten zuzuschreiben ist.
- Im methodischen Teil dieser Arbeit wird eine breite Palette von direkten und indirekten Möglichkeiten zum Ploidienachweis angewendet und zusammenfassend bewertet.
- Zur Klärung des Phänomens der „Partnerinduktion“ ist ein Untersuchungsansatz erarbeitet.
- Die besondere Charakteristik der „epigenetischen Periklinalchimäre“ erforderte eine Einordnung in bekannte Blütenfarbvariationen. Dabei ist versucht worden, einen vorläufigen Bestimmungsschlüssel (3.9.) zu erarbeiten, der der Dynamik von Blütenfarbveränderungen gerecht werden soll und Arbeitsgrundlage für weiterführende Untersuchungen sein kann.
- Nachfolgend sind in der Farbtabelle II die aus dem Sternmuster der transgenen Petunie hervorgegangenen Typen in Form eines Stammbaumes aufgezeichnet.

Stammbaum der Sternmuster

einschließlich der Entmischungsprodukte
und Sproßvarianten (vegetative Ebene)



- **Erklärungen zum Stammbaum der Sternmuster**

- 1 spontan als Sproßvariante und nach Kalluskultur
 - 2 Erklärungsmöglichkeiten: **1.** Perforation von L1 (Verdrängung von L1-bürtigem durch L2-bürtiges Gewebe) bzw. bei Kalluskultur Regeneration aus subepidermalem Gewebe (Entmischungsvorgänge)
 - 2.** Deblockade des A1-Gens in L1
- 2 spontan als Sproßvariante und nach Kalluskultur entstanden
 - 2 Erklärungsmöglichkeiten: **1.** Reduplikation von L1 (Verdrängung von L2-bürtigem durch L1-bürtiges Gewebe) bzw. bei Kalluskultur Regeneration aus epidermalem Gewebe (Entmischungsvorgänge)
 - 2.** Blockade des A1-Gens in L2 (evtl. auch in L3)
- 3 Sternmusterbildung an weiß/diploid durch Deblockade des A1-Gens in L2
- 4 Behandlung von Stern/DDD mit Kolchizin
- 5 Entstehung eines tetraploiden, rot blühenden Typs, roter Farbton intensiver als bei diploid/rot
- 6 Entstehung der Ploidiechimäre Stern/TDD
- 7 Entstehung der Ploidiechimäre Stern/DP?
- 8 nach Kalluskultur entstanden, verkörpert L2-Komponente von Stern/TDD (Entmischungsvorgang)
- 9 spontan als Sproßvariante und nach Kalluskultur entstanden, verkörpert L1-Komponente von Stern/TDD (Entmischungsvorgänge)
- 10 Sternmusterbildung an weiß/tetraploid durch Deblockade des A1-Gens in L2
- 11 spontan als Sproßvariante und nach Kalluskultur entstanden
 - 2 Erklärungsmöglichkeiten: **1.** Reduplikation von L1 (Verdrängung von L2-bürtigem durch L1-bürtiges Gewebe) bzw. bei Kalluskultur Regeneration aus epidermalem Gewebe (Entmischungsvorgänge)
 - 2.** Blockade des A1-Gens in L2 (evtl. auch in L3)
- 12 Sternmusterbildung an weiß/tetraploid durch Deblockade des A1-Gens in L2

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ADANIYA, S/ ARDIAN (1994)
„A NEW METHOD FOR SELECTING CYTOCHIMERAS BY THE MAXIMUM
NUMBER OF NUCLEOLI PER CELL IN *ALLIUM WAKEGI* TRAKI AND A.
FISTOLOSUM L.“
EUPHYTICA 79: 5-12
- BAILEY, L.H. (1896)
„THE SURVIVAL OF THE UNLIKE“
THE MAXIMILLIAN COMPANY NEW YORCK / LONDON
- BALKEMA, G.H. (1972)
„DIPLONTIC DRIFT IN CHIMERIC PLANTS“
RADIAT. BOT. 12: 51-55
- BARANYI, M. / GREIHUBER, J. (1996)
„FLOW CYTOMETRIC AND FEULGEN DENSITOMETRIC ANALYSIS OF
GENOM SIZE VARIATION IN *PISUM*“
TAG 92: 297-307
- BATESON, W. (1916)
„ROOT CUTTINGS; CHIMAERAS AND SPORTS“
JOURN. GENET. 6: 75-80
- BATESON, W. (1926)
„SEGREGATION“
JOURN. GENET. 16:201
- BERGANN, F. (1954/55)
„PRAKTISCHE KONSEQUENZEN DER CHIMÄRENFORSCHUNG FÜR DIE
PFLANZENZÜCHTUNG“
REFERAT ANLÄSSLICH DER 2. VORTRAGSTAGUNG DER LANDWIRT.-
GÄRTN.-FAKULTÄT DER KARL-MARX-UNIVERSITÄT LEIPZIG / MATHEM.-
NATURWISS. REIHE, HEFT 3/4
- BERGANN, F. (1955)
„EINIGE KONSEQUENZEN DER CHIMÄRENFORSCHUNG FÜR DIE
PFLANZENZÜCHTUNG“
ZEITSCHR. F. PFLANZENZÜCHTUNG BAND 34, HEFT 2: 113-124
- BERGANN, F. (1961)
„ÜBER ZWISCHENZELLIGE GENWIRKUNGEN (PARTNERINDUKTIONEN)
BEI DER PIGMENTBILDUNG IN DEN BRAKTEEN DER PERIKLINAL-
CHIMÄRE *EUPHORBIA PULCHERRIMA* WILLD. 'ECKES ROSA'“
BER. DEUTSCH. BOT. GES. 73: 40-41
- BERGANN, F. (1962)
„ÜBER DEN NACHWEIS ZWISCHENZELLIGER GENWIRKUNGEN
(PARTNERINDUKTIONEN) BEI DER PIGMENTBILDUNG IN DEN BRAKTEEN
DER PERIKLINALCHIMÄRE *EUPHORBIA PULCHERRIMA* WILLD.
ECKES ROSA'“
BIOLOGISCHES ZENTRALBLATT BAND 81
- BERGANN, F. (1967)
„MUTATIONSCHIMÄREN: ROHMATERIAL ZÜCHTERISCHER
WEITERBEHANDLUNG“
UMSCHAU 1967 HEFT 24: 71-79

- BERGANN, F. / BERGANN, L. (1962)
 „ÜBER UMSCHICHTUNGEN (TRANSLOKATIONEN) AN DEN
 SPROSSSCHEITELN PERIKLINALER CHIMÄREN“
 DER ZÜCHTER 32: 110- 119
- BEYER, H. / RIESENBERG, H. (1988)
 „HANDBUCH DER MIKROSKOPIE“
 VEB VERLAG TECHNICK BERLIN / 3., STARK BEARBEITETE AUFLAGE
- BIANCHI, F. / CORNELISSEN, P. / GERATS, A. / HOGERVORST, J. (1978)
 „REGULATION OF GENE ACTION IN *PETUNIA HYBRIDA* : UNSTABLE
 ALLELES OF A GENE FOR FLOWER COLOUR“
 TAG 53/ 4 : 157- 167
- BINO, R.J. / BIANCHI, F. / WIJSMAN, H. (1984)
 „PERICLINAL CHIMAERISM IN *PETUNIA* DEMONSTRATED BY
 REGENERATION OF PLANTS FROM THE MUTATED EPIDERMAL LAYER“
 HEREDITY 52/ 3 : 437- 441
- BLAKESLEE, A.F. / AVERY, A.G. (1937)
 „METHODS INDUCING DOUBLING OF CHROMOSOMES IN PLANTS“
 THE JOURNAL OF HEREDITY 28: 393-411
- BLAKESLEE, A.F./ SATINA, S / AVERY, A.G. (1940)
 „UTILIZATION OF INDUCED PERICLINAL CHIMERAS IN DETERMINING
 THE CONSTITUTION OF ORGANS AND THEIR ORIGIN FROM THE THREE
 GERM LAYERS IN *DATURA*“
 SCIENCE 91:425
- BRABEC, F. (1965)
 „PROPFUNG UND CHIMÄREN“
 IN: HANDBUCH DER PFLANZENPHYSIOLOGIE
 BAND 15: DIFFERENZIERUNG UND ENTWICKLUNG TEIL 2
 SPRINGER-VERLAG , BERLIN / HEIDELBERG / NEW YORK
- BREWBAKER, J. (1967)
 „GRUNDLAGEN DER MODERNEN GENETIK I : ANGEWANDTE GENETIK“
 GUSTAV-FISCHER-VERLAG / STUTTGART
- BRINK, R. A. (1973)
 „PARAMUTATION“
 ANN. REV. GENET. 7: 129-152
 IN STRICKBERGER, M. W. (1988) UND PATTERSON, G. J. ET AL. (1995)
- CASSELS, A.S. / MINAS, G. (1983)
 „BENEFICIALLY INFECTED AND CHIMERAL *PELARGONIUM*:
 IMPLICATION FOR MICROPROPAGATION BY MERISTEM AND EXPLANT
 CULTURE“
 ACTA HORTICULTURAE 131: 287-297
- CHAT, J. ET AL. (1996)
 „CYTOMETRIC AND MORPHOMETRIC IDENTIFICATION OF DIPLOID,
 TETRAPLOID AND PENTAPLOID PLANTS DERIVED FROM *ACTINIDIA*
ARGUTA (2N=4X) CROSSED WITH A. *DELICIOSA* (2N=6X)“
 PLANT BREEDING 115, 378-384
- CHITTENDEN, R.J. (1927)
 „VEGETATIVE SEGREGATION“
 BIBLIOGR. GENET. 3: 355-442
- COMPTON, M. / GRAY,D.J. / ELMSTROM, G.W. (1996)
 „IDENTIFICATION OF TETRAPLOID REGENERANTS FROM COTYLEDONS
 OF DIPLOID WATERMELON CULTURED IN VITRO“
 EUPHYTICA 87: 165-172

- CORNU, A. / BUGNON, F. (1971)
 „UN EXEMPLE DE RAMIFICATION RESOLUTIV CHEZ LES
 PHANEROGAMES: FORMATION DE INFLORESCENSE SCORPIODE CHEZ
 LE *PETUNIA HYBRIDA*“
 FR. MEM.: 87-98
 IN: SINK, K.C. (1984)
- CORNU, A. / FARCY, E. (1994)
 „UNSTABLE ELEMENTS AT THE LOCUS LUTEUS-1 IN *PETUNIA HYBRIDA*:
 GENETIC ANALYSIS OF THEIR MOBILITY“
 GENETICA 93:171-179
- CORRENS, C. / KAPPERT, H. (1936)
 „VERERBUNGSVERSUCHE MIT BUNTBLÄTTRIGEN SIPPEN XII *PETUNIA
 HYBRIDA* FORMA ALBOMUTABILIS“
 SONDERAUSGABE AUS DEN SITZUNGSBERICHTEN DER PREUSSISCHEN
 AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN
 VERLAG DER AKADEMIE DER WISS. BERLIN
- D'AMATO, F. (1986)
 „SPONTANEOUS MUTATIONS AND SOMACLONAL VARIATION“
 IN „NUCLEAR TECHNIQUES AND IN VITRO CULTURE FOR PLANT
 IMPROVEMENT“
 INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY/ VIENNA
- DARLINGTON, C.D. / LA COUR, L.F. (1963)
 „METHODEN DER CHROMOSOMENUNTERSUCHUNG“
 FRANCKL'SCHE VERLAGSBUCHHANDLUNG W. KELLER & CO /
 STUTTGART
- DERMEN, H. / BAIN, H. (1944)
 „A GENERELL CYTOLOGICAL STUDY OF COLCHICINE POLYPLOIDIE IN
 CRANBERRY“
 AMERICAN J. BOT. 31: 451-463
- DIXON, R.A. (1985)
 „PLANT CELL CULTURE - A PRACTICAL APPROACH“
 IRL PRESS OXFORD / WASHINGTON DC
- DOODEMAN, M. / BOERSMA, E.A. / KOOMEN, W. / BIANCHI, F. (1984)
 „GENETIC ANALYSIS OF INSTABILITY IN *PETUNIA HYBRIDA*“
 TAG, 67/4: 345-355
- ELOMAA, P. ET AL. (1995) „TRANSGEN
 INACTIVATION IN *PETUNIA HYBRIDA* IS INFLUENCED BY THE PROPERTIES
 OF THE FOREIGN GENE“ MOL.GEN.GEN. 248: 649-656
- EMSWELLER, S. L. / BRIERLEY, P. (1940)
 „COLCHICINE INDUCED TETRAPLOIDIE IN *LILIUM*“
 JOURN. OF HEREDITY 31: 223-230
 IN: HAYES, H. K. / IMMER, F. R. (1942)
- EPPERSON, B.K. / CLEGG, M.T. (1992)
 „UNSTABLE WHITE FLOWER COLOUR GENES AND THEIR DERIVATIVES
 IN THE MORNING GLORY“
 THE JOURNAL OF HEREDITY, NOV./DEC. 1992
- FARCY, E. / CORNU, A. (1979)
 „ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ANTHOCYANIN VARIANTS
 ORIGINATING FROM THE UNSTABLE SYSTEM AN2-1 IN *PETUNIA
 HYBRIDA*“
 TAG, 55/6: 273-278

- FORKMANN, G. (1991)
 „FLAVONOIDS AS FLOWER PIGMENTS: THE FORMATION OF THE
 NATURAL SPECTRUM AND ITS EXTENSION BY GENETIC ENGINEERING“
 PLANT BREEDING 106: 1-26,
- FORKMANN, G. / DANGELMAYR, B. (1980)
 „GENETIC CONTROL OF ISOMERASE ACTIVITY IN FLOWERS OF
DIANTHUS CARYOPHYLLUS“
 BIOCHEM. GENETICS VOL. 18, NOS. 5/6
- FORKMANN, G. / RUHNAU, B. (1987)
 „DISTINCT SUBSTRATE SPECIFICITY OF DIHYDROFLAVONOL 4-
 REDUCTASE FROM FLOWERS OF *PETUNIA HYBRIDA*“
 ZEITSCHRIFT F. NATURFORSCHUNG 42 C: 1146-1148
 IN: LINN, F. ET AL. (1990)
- FUNKE, C. (1956)
 „EINE SCHNELLMETHODE ZUR SELEKTION POLYPLOIDER PFLANZEN“
 DIE NATURWISS. 43: 66
- GAUL, H. (1959)
 „ÜBER DIE CHIMÄRENBILDUNG IN GERSTENPFLANZEN NACH
 RÖNTGENBESTRAHLUNG VON SAMEN“
 FLORA 147: 207-241
- GEORGE, E.F. (1987)
 „PLANT CULTURE MEDIA“
 VOL.1: FORMATION AND USES : 1. PLANT TISSUE CULTURE
 EXEGETIC LIMITED EDINGTON / WESTBURY
- GRIESBACH, R.J. (1993)
 „CHARACTERIZATION OF THE FLAVONOIDS FROM *PETUNIA X HYBRIDA*
 FLOWERS EXPRESSING THE A1-GEN OF *ZEA MAIS*“
 HORT SCIENCE 28 (6): 659-660
- GRIESBACH, R.J. (1996)
 „THE INHERITANCE OF FLOWER COLOR IN *PETUNIA HYBRIDA* VILM.“
 THE JOURNAL OF HEREDITY 87: 241-145
- GRIESBACH, R.J. / KAMO, K.K. (1996)
 „THE EFFECT OF INDUCED POLYPLOIDIE ON THE FLAVONOLS OF
PETUNIA ‘MITCHELL’ “
- GUTTERSON, N.C. (1993)
 „MOLECULAR BREEDING FOR COLOUR, FLAVOR AND FRAGRANCE“
 SCIENTIA HORTICULTURAE, 55: 141-160
 ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B. V. / AMSTERDAM/ LONDON/
 NEW YORK/ TOKYO
- HANDRO, W. / RAO, P.S. / HARADA, H. (1973)
 „A HISTOLOGICAL STUDY OF THE DEVELOPMENT OF BUDS, ROOTS AND
 EMBRYOS IN ORGAN CULTURES OF *PETUNIA INFLATA* R. FRIES“
 ANN. BOT. 37: 817-821
- HARDER, R. (1938)
 „ÜBER FARB- UND MUSTERÄNDERUNGEN BEI BLÜTEN“
 DIE NATURWISSENSCHAFTEN 44: 713-722
- HARDING, J. ET AL. (1991): „GENETICS AND BREEDING OF ORNAMENTAL
 SPEZIES“
 KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, NETHERLANDS
- HAYES, H. K. / IMMER, F. R. (1942)
 „METHODS OF PLANT BREEDING“
 J. GENET. 6: 75-80

- HEUERSEL, J. (1972)
 „STUDIE VAN DE OVERING EN DE GENOTYPISCHE VARIABILITEIT VAN
 KLEUR, GROOTE EN VORM VAN DE BLOEMEN BIJ *RHODODENDRON*
SIMSII PLANCH. (*AZALEA INDICA*)“
 PROEFSCHRIFT TOT HET VERKRIJGEN VAN DE GRAAD VAN
 GEAGGREGEEERDE VAN HET ONDERWIJS. R.U.G., GENT 184:162
- HOPKINS, A. A. ET AL. (1996)
 „CHROMOSOME NUMBER AND NUCLEAR CONTENT OF SEVERAL
 SWITCHGRASS POPULATIONS“
 CROP SCIENCE VOL. 36 /NO. 5: 1192-1195
- JORGENSEN, R. (1994)
 „DEVELOPMENTAL SIGNIFICANCE OF EPIGENETIC IMPOSITIONS ON THE
 PLANT GENOME: A PARAGENETIC FUNCTION OF THE CHROMOSOMES“
 DEVELOPMENTAL GENETICS 15 (6): 523-532
- JORGENSEN, R. (1995)
 „COSUPPRESSION, FLOWER COLOUR PATTERNS AND METASTABLE
 GENE EXPRESSION STATES“
 SCIENCE, VOL. 268
- KAMO, K. / GRIESBACH, R. (1993)
 „PLOIDIE CHANGES IN 'MITCHELL' *PETUNIA*“
 ACTA HORTICULTURAE 336: 307-314
- KIRK, J. / TILNEY-BASSETT, R. (1967)
 „THE PLASTIDS“
 W.H. FREEMAN AND COMPANY / LONDON/ SAN FRANCISCO
- KNY, L. (1902)
 „ÜBER DEN EINFLUSS VON ZUG UND DRUCK AUF DIE RICHTUNG DER
 SCHEIDEWÄNDE IN SICH THEILENDEN PFLANZENZELLEN (ZWEITE
 MITTHEILUNG)
 JAHRBUCH WISS. BOT. 31: 391-392
- KUCKUCK, H. / KOBABE, G. / WENZEL, G. (1985)
 „GRUNDZÜGE DER PFLANZENZÜCHTUNG“
 VERLAG WALTER DE GRUYTER, BERLIN UND NEW YORK / 5. AUFLAGE
- LANGE, D. (1992)
 „VARIABILITÄT BEI DER IN VITRO-VERMEHRUNG VON *SAINTPAULIA*
IONANTHA H. WENDL.“
 DISSERTATION HUMBOLDT-UNIVERSITÄT BERLIN /
 LANDWIRTSCHAFTLICH-GÄRTNERISCHE FAKULTÄT
- LARKIN, P.J./ SCOWCROFT, W.R. (1981)
 „SOMACLONAL VARIATION - A NOVEL SOURCE OF VARIABILITY FROM
 ALL CULTURES FOR PLANT IMPROVEMENT“
 TAG 60: 197-214
- LARKIN, P.J./ SCOWCROFT, W.R. (1982)
 „SOMACLONAL VARIATION: A NEW OPTION FOR PLANT IMPROVEMENT“
 IN: VASIL, I.K. / SCOWCROFT, W.R. / FREY, K.J.
 „PLANT IMPROVEMENT AND SOMATIC CELL GENETICS“
 ACADEMIC PRESS/ NEW YORK/ LONDON/ PARIS, S:156-178
- LESEMANN, D.E. / WOHLERS, W. (1996)
 „VIRUSKRANKHEITEN AN STECKLINGSVERMEHRTEN PETUNIEN“
 FORSCHUNGSREPORT
 BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND
 FORSTEN

- LEVAN, A aus ELLIOTT, F:C (1958):
IN: SCHMALZ, H. (1989): S. 311
- LINEBERGER, R.D. (1996)
„ORIGIN, DEVELOPMENT AND PROPAGATION OF CHIMERAS“
[HTTP://AGGIE-HORTICULTURE CHIMERALEC/CHIMERAS.HTML](http://aggie-horticulture.chimeralec/chimeras.html)
- LINEBERGER, R.D. / DRUCKENBROD, M. (1985)
„CHIMERAL NATURE OF THE PINWHEEL FLOWERING AFRICAN VIOLETS
SAINTPAULIA, *GESNERIACEAE*“
AMER. J. BOT.: 72/8: 1204-1212
- LINN, F. / HEIDMANN, I. / SAEDLER, H. / MEYER, P. (1990)
„EPIGENETIC CHANGES IN THE EXPRESSION OF THE MAIZE A1 GENE IN
PETUNIA HYBRIDA: ROLE OF NUMBERS OF THE INTEGRATED GENE
COPIES AND STATE OF METHYLATION“
MGG: 222: 329-336
- LINTILHAC, P. M. (1974)
DIFFERENTIATION, ORGANOGENESIS AND TECTONICS OF CELL WALL
ORIENTATION II / SEPARATION OF STRESSES IN A TWO DIMENSIONAL
MODEL“
AMER. J. BOT. 61: 135-140
- MARCOTRIGIANO, M. (1997)
„CHIMERAS AND VARIEGATION: PATTERNS OF DECEIT“
HORT SCIENCE VOL. 32(5)
- MARTEL, E. ET AL. (1997)
„GENOME SIZE VARIATION AND BASIC CHROMOSOME NUMBER IN
PEARL MILLET AND FOURTEEN RELATED *PENNISETUM* SPECIES“
THE JOURNAL OF HEREDITY 88: 139-143
- MATZKE, M.A. ET AL. (1994)
„HOMOLOGY DEPENDENT GENE SILENCING IN TRANSGENIC PLANTS:
EPISTATIC SILENCING LOCI CONTAIN MULTIPLE COPIES OF
METHYLATED TRANSGENES
MGG: 244/3: 219
- MATZKE, M.A./ MATZKE, A.J.M. (1990)
„GENE INTRACTION AND EPIGENETIC VARIATION IN TRANSGENIC
PLANTS“
DEVELOPMENTAL GENETICS 11: 214-223
- MEYER, P. (1991)
„ENGINEERING OF NOVEL FLOWER COLOURS“
IN: HARDING, J. ET AL. (1991)
- MEYER, P. (1995, A)
„GENEXPRESSION IN TRANSGENEN PFLANZEN“
MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR ZÜCHTUNGSFORSCHUNG KÖLN 1993-1995
(PUBLIKATION DES MPI)
- MEYER, P. (1995, B)
„VARIATION OF TRANSGENE EXPRESSION IN PLANTS „
EUPHYTICA 85: 359-366,
- MEYER, P. / HEIDMAN, I. / FORKMANN, G. / SAEDLER, H. (1987)
„A NEW *PETUNIA* FLOWER COLOUR GENERATED BY TRANSFORMATION
OF A MUTANT WITH A MAIZE GENE“
NATURE: 330: 677-688

- MEYER, P. / HEIDMANN, I. (1994)
 „EPIGENETIC VARIANTS OF A TRANSGENIC *PETUNIA* LINE SHOW HYPERMETHYLATION IN TRANSGENE DNA: AN INDICATION FOR SPECIFIC RECOGNITION OF FOREIGN DNA IN TRANSGENIC PLANTS“
 MGG 243: 390-399
- MEYER, P. / LINN, F. / HEIDMANN, I. / MEYER, H. / NIEDENHOF, I. / SAEDLER, H. (1992)
 „ENDOGENOUS AND ENVIRONMENTAL FACTORS INFLUENCE 35S-PROMOTOR METHYLATION OF A MAIZE A1 GENE CONSTRUCT IN TRANSGENIC *PETUNIA* AND ITS COLOUR PHENOTYPE“
 MGG 231: 345-352
- MEYER, P. / HEIDMANN, I. / NIEDENHOF, I. (1993)
 „DIFFERENCES IN DNA-METHYLATION ARE ASSOCIATED WITH A PARAMUTATION PHENOMEN IN TRANSGENIC *PETUNIA*“
 PLANT JOURNAL 4: 89-100
- MURALI, S. ET AL. (1996)
 „REGENERATION THROUGH SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM PETAL-DERIVED CALLI OF *ROSA HYBRIDA* L. CV. ARIZONA (HYBRID TEA)“
 EUPHYTICA 91: 271-275
- MURASHIGE, T / SKOOG, F. (1962)
 „A REVISED MEDIUM FOR RAPID GROWTH AND BIOASSAYS WITH TOBACCO TISSUE CULTURES“
 PHYSIOL. PLANT 15: 473-497
- NAPOLI, C. ET AL. (1990)
 „INTRODUCTION OF A CHIMERIC CHALCONE SYNTHASE GENE INTO *PETUNIA* RESULTS IN REVERSIBLE COSUPPRESSION OF HOMOLOGOUS GENES IN TRANS“
 PLANT CELL 2: 279-289
- NAPP-ZINN, K. (1984 UND 1988)
 „ANATOMIE DES BLATTES 1 / ANGIOSPERMEN B1“
 „ANATOMIE DES BLATTES 2 / ANGIOSPERMEN B2“
 GEBRÜDER BORNTRÄGER VERLAG, BERLIN UND STUTTGART
- NATARELLA, N.J. / SINK, K.C. (1974)
 „A THIN-LAYER CHROMATOGRAPHIC STUDY OF PHENOLICS OF SPECIES ANCESTRAL TO *PETUNIA HYBRIDA* VILM.
 THE JOURN. OF HEREDITY 65:85-90
- NATARELLA, N.J. / SINK, K.C. (1975)
 „ELEKTROPHORETIC ANALYSIS OF PROTEIN AND PEROXIDASES OF SELECTED *PETUNIA* SPECIES AND CULTIVARS“
 BOT. GAZ. 136: 20-26
 IN SINK (1984)
- ODENBACH, W. ET AL. (1997)
 „BIOLOGISCHE GRUNDLAGEN DER PFLANZENZÜCHTUNG“
 PAUL PAREY-VERLAG BERLIN
- OLBRICHT, K. / WEGNER, J. (1991)
 „INDUKTION UND IDENTIFIZIERUNG POLYPLOIDER *GERBERA*“
 BELEGARBEIT HUMBOLDT-UNIVERSITÄT BERLIN LANDW.-GÄRTN. FAKULTÄT / FACHB. PFLANZENZÜCHTUNG
- ODU, J. ET AL. (1995)
 „ZÜCHTUNG TRANSGENER, ORANGER PETUNIENSORTEN“
 EUPHYTICA 84: 175-181

- PATTERSON, G.J. ET AL. (1993)
 „PARAMUTATION, AN ALLELIC INTERACTION, IS ASSOCIATED WITH A STABLE AND HERITABLE REDUCTION OF TRANSCRIPTION OF THE MAIZE B REGULATORY GENE“
 GENETICS 135: 881-894
- PATTERSON, G.J. ET AL. (1995)
 „SEQUENCES REQUIRED FOR PARAMUTATION OF MAIZE B GENE MAP TO A REGION CONTAINING THE PROMOTOR AND UPSTREAM SEQUENCES“
 GENETICS 140: 1389-1406
- PEREAU-LEROY, P. (1974)
 „GENETIC INTERACTION BETWEEN THE TISSUES OF CARNATION PETALS AS PERICLINAL CHIMERAS“
 RADIAT. BOT. 14: 109-116
- PLASCHIL, S. (1997)
 „VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZUR HISTOGENETISCH BEDINGTEN STERNMUSTERBILDUNG IN DER PETALENFÄRBUNG BEI *CAMELLIA* L., *MYOSOTIS* L., *PELARGONIUM* L'HERIT. EX AIT., *PHLOX* L., *RHODODENDRON* L., *SAINTPAULIA* H. WENDL., *VERBENA* L.“
 DISSERTATION HUMBOLDT-UNIVERSITÄT BERLIN /
 LANDWIRTSCHAFTLICH-GÄRTNERISCHE FAKULTÄT
- POHLHEIM, F. (1971)
 „*SPIRAEA BUMALDA* 'ANTHONY WATERER' UND *MENTHA ARVENSIS* 'VARIEGATA' - ZWEI IMMERSPALTENDE PERILINALCHIMÄREN UNTER DEN ANGIOSPERMEN
 BIOLOG. ZENTRALBLATT 90/3: 295-319
- POHLHEIM, F. (1978)
 „UNTERSUCHUNGEN AN *ANTHIRRHINUM MAJUS* 'WETTSTEINII', EINER AN VEGETATIV HAPLOIDEN PFLANZEN ENTSTANDENEN SPROSSVARIANTE“
 ZBL. BIOL. 97: 53-67
- POHLHEIM, F. (1980)
 „PERIKLINALCHIMÄRISCHE ANTHOCYANMUSTER BEI *SAINTPAULIA IONANTHA* H. WENDL. NACH NMH-BEHANDLUNG“
 ARCH. F. ZÜCHTUNGSFOR.: 10: 261-269
- POHLHEIM, F. (1982)
 „KLONVARIABILITÄT DURCH CHIMÄRENUMLAGERUNG UND MUTATION BEI *DRACAENA DEREMENSIS* ENGL.“
 ARCH. F. ZÜCHTUNGSFOR.:12: 399-409
- POHLHEIM, F. (1983)
 „INDUKTION VON POLYPLOIDIE AN ADVENTIVSPROSSEN AUS WURZELSTECKLINGEN VON *ERYNGIUM PLANUM* L.“
 WISS. ZEITSCHR. D. PÄDAGOGISCHEN HOCHSCHULE DER UNIVERSITÄT „KARL LIEBKNECHT“ POTSDAM JAHRG. 27, HEFT 1: 157-163
- POHLHEIM, F. (1986)
 „ÜBER SCHICHTENTRANSLOKATION AN PERIKLINALCHIMÄRISCHEN SPROßSCHEITELN VON *EUPHORBIA PULCHERRIMA* WILLD.“
 ARCH. F. ZÜCHTUNGSFOR.:1: 133-144
- POHLHEIM, F. / KAUFHOLD, M. (1985)
 „ON THE FORMATION OF VARIEGATION PATTERNS IN *FILIPENDULA ULMARIA* 'AUREO VARIEGATA' THROUGH CHANGES IN THE PLANE OF CELL DIVISION IN THE EPIDERMISSES OF YOUNG LEAVES“
 FLORA 177:167-174

- POHLHEIM, F. / RÖSSEL, K. (1989)
 „PARTNERINDUKTION BEI CHIMÄRISCHEN BLATT- UND
 BLÜTENFARBMUSTERN VON *PELARGONIUM*“
 TAGUNGSBERICHT AKADEMIE DER LANDWIRTSCHAFTSWISSEN-
 SCHAFTEN DER DDR, BERLIN: 107-115
- PRÖLS, F. / MEYER, P. (1992)
 „THE METHYLATION PATTERNS OF CHROMOSOMAL INTEGRATION
 REGION INFLUENCE GENE ACTIVITY OF TRANSFERRED DNA IN *PETUNIA*
HYBRIDA“
 THE PLANT JOURNAL 2/4: 465-475
- PRYOR, R. L. (1972)
 „A TETRAPLOID *GERBERA*“
 HORT SCIENCE VOL. 7 (2): 197-198
- RASCH, D. (1988)
 „EINFÜHRUNG IN DIE BIOSTATISTIK“
 VEB DT. LANDWIRTSCHAFTSVERLAG BERLIN / 3. AUFLAGE
- RASHID, J. (1993)
 „UNTERSUCHUNGEN ZUR MUSTERANALYSE VARIEGATER FORMEN DER
 GATTUNGEN *HEDERA*, *SCHEFFLERA* UND *POLYSCIAS*“
 DISSERTATION HUMBOLDT-UNIVERSITÄT BERLIN
 FACHBEREICH AGRAR- UND GARTENBAUWISSENSCHAFTEN
- REDDY, A.R. ET AL. (1987)
 „THE A1 (ANTHOCYANIN 1) LOCUS IN *ZEA MAIS* MAYS ENCODES
 DIHYDROQUERCETIN REDUCTASE“
 PLANT SCIENCE 52/7
 IN: WIENAND, U. ET AL. 1990
- RIEGER, R. (1963)
 „GENOMMUTATION“
 G.-FISCHER-VERLAG JENA
- RISCHKOW, J. (1936)
 „BUNTBLÄTTRIGE CHIMÄREN UND DER URSPRUNG DES MESOPHYLLS
 BEI DIKOTYLEDONEN“
 GENETICA 18: 313-336
- ROMEIS, B. ET AL. (1989)
 „MIKROSKOPISCHE TECHNIK“
 URBAN UND SCHWARZENBERG MÜNCHEN/ WIEN/ BALTIMORE /
 17. AUFLAGE
- RÖSSEL, K. (1990)
 „GENETISCHE MARKIERUNGEN ZUR QUANTITATIVEN MUSTERANALYSE
 AN SOMATISCHEN VARIANTEN EINES MONOHAPLOIDEN *PELARGONIUM*-
 KLONES“
 DISSERTATION HUMBOLDT-UNIVERSITÄT BERLIN /
 LANDWIRTSCHAFTLICH-GÄRTNERISCHE FAKULTÄT
- RÜNGER, W. (1971)
 „BLÜTENBILDUNG UND BLÜTENENTWICKLUNG“
 PAUL PAREY-VERLAG / BERLIN UND HAMBURG
- RÜNGER, W. (1976)
 „LICHT UND TEMPERATUR IM ZIERPFLANZENBAU“
 VERLAG PAUL PAREY BERLIN UND HAMBURG, 3. ERWEITERTE
 AUFLAGE

- RUPPRECHT, H. / MIESSNER, E. (1989)
 „ZIERPFLANZENBAU“
 VEB DT. LANDW.- VERLAG BERLIN, 2. AUFLAGE
- SABL, J.F. UND LAIRD, C.D. (1992)
 „EPIGENE CONVERSION: A PROPOSAL WITH IMPLICATIONS FOR A GENE
 MAPPING IN HUMANS“
 AM.JOURN.HUMAN GENET. 50: 1171-1177
- SANTOS, R.F./ HANDRO, W. (1983)
 „MORPHOLOGICAL PATTERNS IN *PETUNIA HYBRIDA* PLANTS
 REGENERATED FROM TISSUE CULTURES AND DIFFERING BY THEIR
 PLOIDY“
 TAG 66/1: 55-60
- SCHEIBE, A. (1951)
 „EINFÜHRUNG IN DIE ALLGEMEINE PFLANZENZÜCHTUNG“
 VERLAG EUGEN ULMER STUTTGART / LUDWIGSBURG
- SCHMALZ, H. (1989)
 „PFLANZENZÜCHTUNG“
 VEB DT. LANDW.-VERLAG BERLIN / 4. AUFLAGE
- SCHNEIDER, U. (1995)
 „QUANTITATIVE UNTERSUCHUNGEN ZUR GEWEBEKONKURRENZ AUF
 VERSCHIEDENEN DIFFERENZIERUNGSEBENEN“
 DIPLOMARBEIT HUMBOLDT-UNIVERSITÄT BERLIN
 LANDWIRTSCHAFTL.-GÄRTN. FAKULTÄT / FACHB. PFLANZENZÜCHTUNG
- SCHWANITZ, F. (1952)
 „EINIGE KRITISCHE BEMERKUNGEN ZUR METHODE DER BESTIMMUNG
 DER PLOIDIE DURCH MESSUNG DER POLLEN- UND
 SPALTÖFFNUNGSGRÖßE“
 DER ZÜCHTER 22: 273-275
- SINK, K.C. (1984)
 „*PETUNIA*“
 SPRINGER-VERLAG, BERLIN
- SKIEBE, K. (1966)
 „POLYPLOIDIE UND FERTILITÄT“
 Z. F. PFLANZENZÜCHTUNG 56 / 301-342
- SKIRVIN, R. M. ET AL. (1994)
 „SOURCES AND FREQUENCY OF SOMACLONAL VARIATION“
 HORT SCIENCE VOL. 29 (11): 1232-1237
- STEERE, W.C. (1932)
 „CHROMOSOME BEHAVIOR IN TRIPLOID *PETUNIA* HYBRIDS“
 AM. JOURN. OF BOTANY XIX: 340-357
- STRASBURGER, E. ET AL. (1991)
 „LEHRBUCH DER BOTANIK“
 GUSTAV FISCHER-VERLAG STUTTGART JENA NEW YORK / 33. AUFLAGE
- STRICKBERGER, M. W. (1988)
 „GENETIK“
 CARL HANSER VERLAG MÜNCHEN / WIEN
- TILNEY-BASSETT, R /1986)
 „PLANT CHIMERAS“
 EDWARD ARNOLD, LONDON

- VAN SLOGTEREN, G.M.S. ET AL. (1984)
 „SILENT T-DNA GENES IN PLANT LINES TRANSFORMED BY
AGROBACTERIUM TUMEFACIENS ARE ACTIVATED BY GRAFTING AND
 BY 5-AZACTIDINE TREATMENT
 PLANT MOLEC.BIOL. 3: 333-336
- VOGEL, G. / ANGERMANN, H. (1979)
 „TASCHENBUCH DER BIOLOGIE“
 VEB GUSTAV FISCHER VERLAG JENA, 2. BEARBEITETE AUFLAGE
- WALTER, F. (1961)
 „EINE NEUE METHODE ZUR FESTSTELLUNG POLYPLOIDIE BEI *BETA* -
 RÜBEN“
 DER ZÜCHTER 31: 6
- WEBERLING, F. (1981)
 „MORPHOLOGIE DER BLÜTEN UND DER BLÜTENSTÄNDE“
 VERLAG EUGEN ULMER, BERLIN
- WIENAND, U. ET AL. (1990)
 „CLONING AND MOLECULAR ANALYSIS OF ANTHOCYANIN GENES IN
ZEA MAYS“
 ‘GENETIC ENGINEERING OF CROP PLANTS’
 BUTTERWORTHS LONDON; BOSTON; SINGAPURE; SYDNEY; TORONTO;
 WELLINGTON
- WINKLER, H. (1912)
 „UNTERSUCHUNGEN ÜBER PROPFBASTARDE“
 VERLAG VON GUSTAV FISCHER, JENA
- WIYBRANDI, J. / DE BOTH, M.T. (1993)
 „TEMPERATE VEGETABLE CROPS“
 SCIENTIA HORTICULTURAE 55: 37-63

7. Abbildungsverzeichnis

- Abb.1:** Sternmuster der transgenen Petunie (Stern/DDD)
- Abb.2:** handelsübliche Sternmustersorte der Petunie
- Abb.3:** Sternmuster bei der transgenen Petunie
- Abb.4:** Verzweigungsmodus (Photoprintbild/Stereomikroskop)
- Abb.5:** Kronblatt im Querschnitt (Kunststoffeinbettung)
- Abb.6:** obere Petalenepidermis Stern/DDD (Plasmolyse mit KNO_3 -Lösung)
- Abb.7:** untere Petalenepidermis Stern/DDD (Plasmolyse mit KNO_3 -Lösung)
- Abb.8:** Farbstoffverteilung im Petalenquerschnitt (rotes Binnenfeld Stern/DDD)
- Abb.9:** Stomata Stern /DDD
- Abb.10:** Stomata Stern Nr.1
- Abb.11:** Petalenquerschnitt (rotes Binnenfeld) Stern/DDD
- Abb.12:** Petalenquerschnitt (rotes Binnenfeld) Stern Nr.1
- Abb.13:** obere Epidermis (rotes Binnenfeld) Stern/DDD
- Abb.14:** obere Epidermis (rotes Binnenfeld) Stern Nr.1
- Abb.15:** untere Epidermis (rotes Binnenfeld) Stern/DDD
- Abb.16:** untere Epidermis (rotes Binnenfeld) Stern Nr.1
- Abb.17:** obere und untere Petalenepidermis Stern/DDD, angefärbt mit Karmin-Essigsäure
- Abb.18:** obere und untere Petalenepidermis Stern Nr.1, angefärbt mit Karmin-Essigsäure
- Abb.19:** Sproßscheitellängsschnitt Stern/DDD (in Kunststoff)
- Abb.20:** Sproßscheitellängsschnitt Stern Nr.1 (in Kunststoff)
- Abb.21:** Petalenquerschnitt Stern/DDD (in Kunststoff)
- Abb.22:** Petalenquerschnitt Stern Nr.1 (in Paraffin), (---- ----- Ploidiegrenze)
- Abb.23:** Petalenmesophyll im Übergangsbereich von rot zu weiß, Stern/DDD (Aufsicht)
- Abb.24:** Petalenmesophyll im Übergangsbereich von rot zu weiß, Stern Nr.1 (Aufsicht)
- Abb.25:** Chromosomenbelege Stern/DDD für L1-bürtiges (14 Chromosomen in Petalenepidermis zählbar), L2-bürtiges (14 Chromosomen in subepidermalem Petalengewebe zählbar) und L3-bürtiges Gewebe (13 Chromosomen in Blütenstielmitte zählbar, Abweichung von Sollzahl methodisch bedingt), Kunststoffeinfettung
- Abb.26:** Chromosomenbelege Stern Nr.1 für L1-bürtiges, (28 Chromosomen in Petalenepidermis zählbar), L2-bürtiges (14 Chromosomen in subepidermalem Petalengewebe zählbar) und L3-bürtiges Gewebe (12 Chromosomen in

- Blütenstiellmitte zählbar, Abweichung von Sollzahl methodisch bedingt),
Kunststoffeinbettung
- Abb.27:** Stern/DDD (oben) und Blüten der Kallusregenerate
- Abb.28:** Stern/TDD (oben) und Blüten der Kallusregenerate
- Abb.29:** meiotische Zellen in Antheren von weiß/diploid (Kunststoffeinbettung, maximal 7 Chromosomen zählbar)
- Abb.30:** 14 Chromosomen in Petalenepidermis (L1-bürtig) von weiß/diploid (Kunststoffeinbettung)
- Abb.31:** 14 Chromosomen in subepidermalem Petalengewebe (im Photo L2-bürtig) von weiß/diploid (Kunststoffeinbettung)
- Abb.32:** Petalenquerschnitt von weiß/diploid: alle Zellkerne besitzen gleiche Größe (Kunststoffeinbettung)
- Abb.33:** weiß/tetraploid: 26 Chromosomen in subepidermaler Lage (L2-bürtig) zählbar (Abweichung von Sollzahl 28 methodisch bedingt), Petalenquerschnitt in Kunststoff
- Abb.34:** Im Photo sind jeweils maximal 3 Kernkörperchen in der Antherenhülle (L1-bürtig) von weiß/tetraploid zählbar: Hinweis auf Tetraploidie (Abweichung von Sollzahl 4 Nucleoli methodisch bedingt), Kunststoffeinbettung
- Abb.35:** Petalenquerschnitt von weiß/tetraploid: alle Zellkerne besitzen gleiche Größe, Kunststoffeinbettung
- Abb.36:** Sproßscheitellängsschnitt von rot/diploid: Zellkerne besitzen gleiche Größe in allen Schichten, Kunststoffeinbettung
- Abb. 37:** Chromosomenbelege rot/diploid für L1-bürtige (Laubblattepidermis), L2-bürtige (Laubblatt subepidermal) und L3-bürtige Gewebe (Blütenstiellmitte), Kunststoffeinbettung
- Abb.38:** Nucleoli bei rot/diploid (Blütenstiel) in epidermalem (L1-bürtig), subepidermalem (L2-bürtig) und L3-bürtigem Gewebe (Gefäß Blütenstiellmitte)
- Abb.39:** diploide Blüte (links) und Blüte von Typ Nr.3
- Abb.40:** Blütentyp Nr.2: Stern/DP?
- Abb.41:** meriklinalchimärische Blüte mit den Konstitutionen diploid-polyploid (links oben) und polyploid-polyploid (restliche Hälfte)
- Abb.42:** Stern/TTT links und Stern/DDD
- Abb.43:** Sproßscheitellängsschnitt Stern/TTT, Kunststoffeinbettung

- Abb.44:** Sproßscheitellängsschnitt Stern/TTT mit Metaphase in L1 (27 Chromosomen gezählt: Soll 28, Abweichung methodisch bedingt), in L2 Zellkern mit 4 Nucleoli→Tetraploidie, Kunststoffeinbettung
- Abb.45:** Sternmusterblüte an Laubblattvariante G HGG G
- Abb.46:** Laubblattmuster G HGG G
- Abb.47:** Sprenkelungsintensitäten auf tetraploider Ebene
- Abb.48:** weiß/tetraploid: Blüte mit rotem Sektor
- Abb.49:** rot/diploid: Blüte mit weißem Sektor
- Abb.50:** Blütenfarbveränderung an rot/tetraploid
- Abb.51:** Kreuzungspartner rot/diploid x 'Marathon Dunkelblau' und Nachkommenschaft
- Abb.52:** Epidermensehma (obere Epidermis) der Kreuzungspartner und der Nachkommen-schaft zur Veranschaulichung der Farbwerte (alle Präparate mit Plasmolyse)
- Abb.53:** blauer Sektor an F1-Typ dunkelrosa
- Abb.54:** heller und blauer Sektor an F1-Typ dunkelrosa
- Abb.55:** roter Sektor (nicht transgener Farbton!) bei unterschiedlichen Nachttemperaturen (>15°C, <15°C, <10°C: Reihenfolge in Leserichtung)
- Abb.56:** F1-Typ hellrosa
- Abb.57:** F1-Typ hellrosa mit Sektor(transgener Farbton!)
- Abb.58:** F1-Typ hellrosa mit zweifarbigem Sektor (transgener und weißer Farbton!)
- Abb.59:** einzelne Farbtypen der **F2**-Generation aus Selbstung (blau♀ x rot ♂) und Selbstung (rot♀ x blau♂)
- Abb.60:** sektorale Farbveränderung
- Abb.61:** Sprenkelung der Blüte (dieser Pflanze immanent)
- Abb.62:** einige Blütenvarianten nach in-vitro-Kalluskultur (diploide und tetraploide Ebene)
- Abb.63:** Laubblattvariante nach Überführung der Kallusregenerate in Erdkultur
- Abb.64:** Laubblattvarianten nach in-vitro-Kalluskultur und an ihnen entstandene Sproßvarianten
- Abb.65:** Umlagerungsprozesse führen zu Sproßvarianten
- Abb.66:** Sternmustersorten der Petunie: Variabilität in der Farbverteilung aufgrund von veränderten Temperatur-und Lichtverhältnissen
- Abb.67:** *Convolvulus arvensis*
- Abb.68:** *Solanum gentianoides*

- Abb.69:** *Pelargonium-Peltatum*-Hybride ‘Mexikanerin’
- Abb.70:** *Pelargonium-Peltatum*-Hybride ‘Mexican Beauty’
- Abb.71:** *Saintpaulia ionantha* ‘Mandy’,
als weiß-blau-blau (L1-L2-L3)-Chimäre nachgewiesen (PLASCHIL, 1997)
- Abb.72:** *Syringa vulgaris* L. ‘Sensation’,
Sport von ‘Hugo de Vries’ regelmäßiger weißer Rand, Untersuchungen notwendig
- Abb.73:** *Phlox maculata* L. ‘Natascha’,
regelmäßiger weißer Rand (Existenz ähnlicher Sorten in den 30er Jahren dieses Jahrhunderts: Auskunft Staudengärtnerei), Untersuchungen notwendig
- Abb.74:** *Phlox subulata* L. ‘Striped Candy’,
chimärische Konstitution wahrscheinlich (PLASCHIL, 1997)
- Abb.75:** *Pelargonium-Zonale*-Hybride ‘Mr. Wren’,
chimärischer Charakter (weiß-rot-rot) wahrscheinlich, insbesondere im Herbst (Temp.↓) treten im weißen Petalenrand isoliert vom roten Binnenfeld rote Sprenkel auf, Wurzelaustrieb rotblühend, F1-Aufspaltung in rot und rosa (PLASCHIL, 1997), Untersuchungen notwendig
- Abb.76:** *Rhododendron simsii*. Planch. ‘Mevrouw Gerard Kint’,
stabile weiße Randbildung am Kronblatt, Periklinalchimärie wahrscheinlich (PLASCHIL, 1997)
- Abb.77:** *Rhododendron japonicum* Suring. ‘Kermesina Rose’,
Weißrand am Kronblatt relativ stabil, rote Sektoren und rote Blüten möglich (Entmischung ?), chimärische Konstitution wahrscheinlich, Untersuchungen notwendig
- Abb.78:** *Rhododendron simsii* ‘Weißrand, gesprenkelt’,
chimärischer Charakter wahrscheinlich, Untersuchungen notwendig, weißer Rand, rosa Binnenfeld, rote Sprenkelung über die gesamte Petale, Auftreten gänzlich roter Blüten (spontan), weißgerandeter Sektor ohne Anthocyan (spontan)
- Abb.79:** *Rhododendron simsii* ‘Weißrand, gesprenkelt’,
weißgerandeter Sektor (ohne Sprenkel)
- Abb.80:** *Viola sororia* Willd. ‘Weiß mit blauen Adern’,
als Sorte im Handel, relativ gleichmäßige Sprenkelung, Untersuchungen notwendig
- Abb.81:** *Spiraea x bumalda* Burvenich ‘Shirobana’,

spontane, sektorale Rotfärbung ansonsten weißer Blüten bzw. ganzer Teile des Blütenstandes, sektorale Anthocyanfärbung ist bereits im Sproß und an den Laubblättern sichtbar, Untersuchungen notwendig

Abb.82: *Pelargonium-Zonale* - Hybride 'Eggshell',
weiße Blüten mit unterschiedlich großen roten Anteilen, Auftreten gänzlich roter Blüten, Aufspaltung der Nachkommenschaft in rot / weiß / weiß mit roten Anteilen (PLASCHIL: mündliche Information), Untersuchungen notwendig

Abb.83: *Rosa hybrida* L. 'Astrid Späth',
rosa Blüte mit roten Anteilen, Auftreten gänzlich roter Blüten, Untersuchungen notwendig

Abb.84: *Impatiens*-Hybride:
Blütensprenkelung vererbbar

Abb.85: *Rosa foetida* L. 'Bicolor',
Petalenoberseite rot, Unterseite gelb, spontan gelbe Sektoren (relativ häufig), oranger Mischtyp (selten), roter Sektor Petalenunterseite (selten), Untersuchungen notwendig

rechts: Querschnitt Petale mit gelbem Sektor (Petalenoberseite) und rotem Sektor (Petalenunterseite)

Abb.86: zwei Homohistonten: Stern/TTT und Stern/DDD

Abb.87: zwei Ploidiechimären: Stern/TDD und Stern/DP?

Abb.88: Kallus aus Petalensegment

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß die vorliegende Arbeit von mir und nur mit Hilfe der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Ebenfalls erkläre ich, daß die Arbeit erstmalig und nur an der Humboldt-Universität zu Berlin eingereicht wurde.

Berlin, am 4. Mai 1998

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denen bedanken, die beabsichtigt oder unbeabsichtigt meine Arbeit an dieser Dissertation ermöglicht oder befördert haben.

Wenn eine solche Arbeit fertiggestellt wird, ist das nicht nur das Resultat von Interesse, Mühe, ein paar guten Einfällen, Geld und Zeit, sondern letztendlich auch die Folge von Konstellationen, zu denen ganz vordringlich Menschen gehören.

Die damit verbundenen, überwiegend schönen Erfahrungen werden erhalten bleiben, wenn Details aus dieser Arbeit von mir vielleicht vergessen sind.